



Ana Soraia de Oliveira Mendo

Licenciada

**Caracterização do potencial anti-tumoral e
identificação de alvos biológicos de um complexo
de cobre com terpiridinas**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Genética Molecular e Biomedicina

Orientadora: Maria Alexandra Núncio de Carvalho Ramos Fernandes,
Professora Doutora, FCT/UNL

Co-orientadora: Susana Isabel Rodrigues dos Santos, Professora Doutora,
FECN/ULHT

Júri:

Presidente: Professora Doutora Ilda Santos Sanches

Arguente: Professor Doutor Pedro Viana Baptista

Vogal: Professora Doutora Alexandra Fernandes



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2013

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

Ana Soraia de Oliveira Mendo

**Caracterização do potencial anti-tumoral e identificação
de alvos biológicos de um complexo de cobre com
terpiridinas**

*Dissertação apresentada para obtenção do Grau de Mestre em
Genética Molecular e Biomedicina, pela Universidade Nova de
Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia*

Orientadora:

Professora Doutora Alexandra Fernandes (FCT/UNL)

Co-orientadora:

Professora Doutora Susana Santos (FECN/ULHT)

Lisboa
2013

Parte do trabalho apresentado nesta dissertação encontra-se no Poster:

Silva, J. F., Silva, A. C., Luís, D. V., Santos, S., Mendo, A. S., Coito, L., Cabral, G., Videira, P., Rodrigues, A. S., Lasri, J., Charmier, A., Guedes da Silva, M. F. C., Ma, Z., Pombeiro, A. J. L., Fernandes, A. R. 2013. *Anti-proliferative activity and biological targets of Pt(II) and Cu(II) compounds*. Second EuCheMS Inorganic Chemistry Conference, Jerusalem, Israel.

O mesmo encontra-se em anexo nesta dissertação.

Caracterização do potencial anti-tumoral e identificação de alvos biológicos de um complexo de cobre com terpiridinas

Copyright Ana Soraia Mendo, FCT/UNL, UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço à Professora Doutora Alexandra Fernandes, minha orientadora, pela oportunidade e confiança depositadas em mim e também pela disponibilidade e auxílio prestado ao longo deste trabalho e que permitiram a execução desta tese da melhor forma possível.

Agradeço igualmente à Professora Doutora Susana Santos, minha co-orientadora, pela disponibilidade e ajuda concedidas ao longo deste tempo e que possibilitaram a realização deste trabalho.

À Professora Doutora Cecília Rodrigues por disponibilizar as linhas de células tumorais HCT116, HepG2 e MCF-7 para os estudos de citotoxicidade.

Ao Professor Doutor António Sebastião Rodrigues por ter concedido a linha celular epitelial mamária MCF-10A para os estudos de citoselectividade.

À Professora Doutora Isabel Correia por ter fornecido a linha celular não-tumoral de fibroblastos para os ensaios de citotoxicidade.

À Professora Doutora Guadalupe Cabral pela colaboração e disponibilidade que permitiram a realização dos ensaios de citometria de fluxo.

Ao Centro de Química Estrutural do Instituto Superior Técnico por ceder o composto utilizado neste trabalho.

Ao Professor Doutor Mário Diniz pois sem ele não teria sido possível realizar os estudos de detecção de ROS.

Ao Miguel Larginho pela ajuda imprescindível na realização do ensaio *Comet* e por ter estado sempre disponível para partilhar os seus conhecimentos neste estudo.

Ao Daniel Luís, à Ana Silva e à Joana Silva por todos os conhecimentos transmitidos que me permitiram realizar este trabalho, pela ajuda prestada, tempo despendido e preocupação demonstrada ao longo de todo o trabalho. Sem vocês isto não teria sido possível.

À minha colega de mestrado e de laboratório, Lídia Coito, pelo apoio e companheirismo durante este ano de trabalho e que ajudou a que esta tese fosse realizada.

Aos restantes colegas de laboratório, Vanda Marques, Marina Pires, Luís Raposo, Catarina Rodrigues e João Jesus pela ajuda prestada em diversas tarefas do quotidiano e também pela boa disposição reveladas dia após dia.

Às minhas amigas Luísa, Joaninha e Carla pelos bons momentos e boa disposição que nos acompanham desde praticamente o primeiro dia de licenciatura.

À minha grande amiga Inês que me atura desde o secundário e com quem eu tenho crescido e aprendido ao longo de todos estes anos. Obrigada pelo apoio, bom humor e preocupação demonstrados desde sempre.

Às minhas avós, Maria do Carmo e Clotilde, pelo simples facto de fazerem parte da minha vida e de me acompanharem desde sempre.

Aos meus avôs, Zé e Alípio, que apesar de já não se encontrarem presentes sei que estariam orgulhos pelas conquistas da neta.

Por fim, um grande obrigada aos meus pais, Ana Maria e Vítor, por terem sempre apoiado as minhas decisões e por fazerem sempre os possíveis para que os meus sonhos fossem realizados. Obrigada por estarem sempre presentes nos bons e principalmente nos maus momentos e por partilharem sorrisos e lágrimas. Obrigada por tudo.

RESUMO

A quimioterapia é um tratamento frequentemente aplicado em pacientes com cancro. No entanto a utilização de agentes quimioterapêuticos provoca efeitos secundários adversos e pode induzir o desenvolvimento de resistência aos mesmos. Neste sentido existe, uma contínua necessidade de desenvolvimento de novos compostos anti-tumorais cada vez mais específicos para as células tumorais. Assim, este trabalho teve como objectivo caracterizar o potencial anti-tumoral de um complexo de cobre contendo como ligandos H_2O , DMSO e 4'-fenil-2,2':6',2''-terpiridina, designado ZM V. Os ensaios *in vitro* nas linhas tumorais HCT116, HepG2 e MCF-7 revelaram valores de IC_{50} de 0,065, 0,187 e 5,401 μM , respectivamente. A avaliação da citoselectividade do ZM V revelou, para linhas celulares não-tumorais, valores de IC_{50} de 7,002 μM para os fibroblastos e de 16,01 μM para as MCF-10A. A marcação com Hoechst 33258 das células HCT116 e HepG2 incubadas com ZM V revelou condensação da cromatina e fragmentação nuclear. A dupla marcação com Anexina V-FITC e IP das células HCT116 demonstrou um elevado número de células em apoptose tardia e os ensaios de RT-PCR revelaram o aumento de expressão de genes pró-apoptóticos. A partir de estudos de interacção com o DNA determinou-se, por espectroscopia de absorção, uma constante de afinidade de $1,39 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, indicando que o composto tem menor capacidade de ligação ao DNA relativamente à doxorrubicina. Estudos *in vitro* de clivagem do DNA plasmídico demonstraram a capacidade do composto induzir quebras em cadeia dupla, confirmando-se pelo ensaio *Comet* a clivagem do DNA nuclear. O ZM V parece ainda induzir um ligeiro atraso na progressão do ciclo celular, sendo que o estudo do proteoma das células HCT116 também aponta nesse sentido. A proteómica permitiu igualmente confirmar a variação dos níveis de proteínas associadas à estimulação da apoptose e à resposta contra o *stress* oxidativo. Assim, procedeu-se à determinação da actividade da glutathione S-transferase e dos níveis de peroxidação lipídica que propõem uma possível formação de radicais livres como parte do mecanismo de acção do composto.

Palavras-chave: Complexos de cobre, ZM V, Interacção com o DNA, Citoselectividade, Proteoma.

ABSTRACT

Chemotherapy is a frequently treatment applied in cancer patients. However, the use of chemotherapeutic agents causes adverse side effects and can induce the development of resistance to them. In this respect, there is a continuous need for development of new anti-tumor compounds more specific for tumor cells. This study aimed to characterize the anti-tumor potential of a copper complex containing ligands such as H₂O, DMSO and 4'-phenyl-2,2':6',2''-terpyridine, designated ZM V. The *in vitro* assay in tumor lines HCT116, HepG2 and MCF-7 showed IC₅₀ values of 0.065, 0.187 and 5.401 μ M, respectively. The cytoselectivity evaluation of the ZM V in non-tumor cell lines revealed IC₅₀ values of 7.002 μ M for fibroblasts and 16.01 μ M for MCF-10A. Hoechst 33258 staining in HepG2 and HCT116 cells incubated with ZM V revealed chromatin condensation and nuclear fragmentation. The double staining with Annexin V-FITC and PI of HCT116 cells showed a large number of cells in late apoptosis and RT-PCR assays revealed increased expression of pro-apoptotic genes. DNA interaction studies by absorption spectroscopy allowed to calculate an affinity constant of $1.39 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, indicating that the compound has a lower DNA binding capacity compared to doxorubicin. The compound is capable of inducing double strand breaks *in vitro* in plasmidic DNA and also to induce nuclear DNA fragmentation by Comet assay. The ZM V seems induce a slight delay in cell cycle progression and the study of the proteome in HCT116 cells also points in this direction. The proteomics also confirmed the levels variation of proteins associated with stimulation of apoptosis and oxidative stress response. Thus, we determined the activity of glutathione S-transferase and lipid peroxidation levels which indicate a possible formation of free radicals as part of the action mechanism of the compound.

Keywords: Copper complexes, ZM V, DNA interaction, Cytoselectivity, Proteomics.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	xix
ÍNDICE DE TABELAS.....	xxi
LISTA DE ABREVIATURAS	xxiii
LISTA DE UNIDADES	xxvii
LISTA DE SÍMBOLOS.....	xxvii
1. Introdução.....	1
1.1. Incidência e Mortalidade no Cancro	1
1.2. Tumorigénese	2
1.3. Morte Celular	6
1.3.1. Apoptose	7
1.4. Ciclo Celular	10
1.5. Proteína Supressora de Tumores p53	13
1.6. Tratamento do Cancro	13
1.7. Compostos Anti-Tumorais	15
1.7.1. Complexos de Cobre	17
1.8. Modelos Biológicos: Linhas Celulares Tumorais	19
1.8.1. Carcinoma Colorectal Humano.....	19
1.8.2. Carcinoma Hepatocelular Humano.....	21
1.8.3. Cancro da Mama Humano	22
1.9. Introdução ao tema da Tese	24
2. Materiais e Métodos	25
2.1. Composto em Estudo	25
2.2. Linhas Celulares Humanas.....	25
2.2.1. Cultura das Linhas Tumorais e Não-Tumorais.....	26
2.2.2. Manutenção das Culturas Celulares	26
2.3. Avaliação do Potencial Citotóxico	26
2.3.1. Ensaio de Viabilidade Celular	26
2.4. Avaliação do Potencial Apoptótico	28
2.4.1. Marcação com a Sonda Hoechst 33258.....	28
2.4.2. Marcação com Anexina V-FITC e Iodeto de Propídio	28
2.5. Expressão de Genes Envolvidos na Apoptose	29

2.5.1. Extracção do RNA total	30
2.5.2. Síntese de cDNA	30
2.5.3. PCR em Tempo Real (RT-PCR)	30
2.6. Progressão do Ciclo Celular	32
2.7. Estudos de Interação com o DNA	33
2.7.1. Espectroscopia de Absorção	33
2.7.2. Interação com a Molécula de DNA	34
2.7.2.1. Cultura de <i>Escherichia coli</i> e Extracção de DNA Plasmídico (pBSKII)	34
2.7.2.2. Estudos de Clivagem de DNA Plasmídico	34
2.7.2.3. Ensaio de Retardamento da Mobilidade Electroforética (EMSA) de pDNA Dependente do Tempo	35
2.8. Electroforese em Gel de Célula Única ou Ensaio <i>Comet</i>	35
2.8.1. Preparação das Lâminas	35
2.8.2. Exposição das Células ao Composto e Preparação das Lâminas	35
2.8.3. Electroforese Alcalina	36
2.8.4. Análise das Lâminas para Observação da Formação de Cometas	37
2.9. Proteómica	37
2.9.1. Exposição das Células ao Composto	37
2.9.2. Extracção, Precipitação e Purificação do Extracto de Proteína total	37
2.9.3. Quantificação do Extracto de Proteína Total	38
2.9.4. Electroforese Bidimensional (2-DE)	38
2.9.5. Focagem Isoeléctrica	38
2.9.6. SDS-PAGE	39
2.9.7. Revelação dos Géis	39
2.10. Detecção de ROS	40
2.10.1. Ensaio da Glutathione S-Transferase	40
2.10.2. Ensaio de Espécies Reactivas ao Ácido Tiobarbitúrico – Peroxidação Lipídica	41
3. Resultados e Discussão	43
3.1. Avaliação do Potencial Citotóxico	43
3.2. Avaliação do Potencial Apoptótico	45
3.2.1. Marcação com a Sonda Hoechst 33258	46
3.2.2. Marcação com Anexina V-FITC e Iodeto de Propídio	48
3.3. Estudo da Expressão de Genes Envolvidos na Apoptose	50
3.4. Progressão do Ciclo Celular	52

3.5. Estudos de Interação com o DNA	55
3.5.1. Espectroscopia de Absorção	55
3.5.2. Estudos de Clivagem de DNA Plasmídico	57
3.5.3. EMSA de pDNA Dependente do Tempo	58
3.6. Electroforese em Gel de Célula Única ou Ensaio <i>Comet</i>	60
3.7. Proteómica	62
3.8. Detecção de ROS	69
3.8.1. Ensaio da Glutathione S-Transferase	69
3.8.2. Ensaio de Peroxidação Lipídica	71
4. Conclusão e Perspectivas Futuras	73
5. Referências Bibliográfica	75
ANEXO	xxix

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 – Tipos de cancro mais comuns a nível mundial para a) sexo masculino e b) sexo feminino (Adaptado de GLOBOCAN, 2008).....	1
Figura 1.2 – Estimativas de incidência e mortalidade dos cancros mais comuns em Portugal (Adaptado de GLOBOCAN, 2008).	2
Figura 1.3 – Esquema representativo do processo multifásico da tumorigénese (Adaptado de Alberts <i>et al.</i> , 2008).	4
Figura 1.4 – Representação das seis principais características adquiridas pelas células durante o processo de tumorigénese (Adaptado de Hanahan e Weinberg, 2000).	4
Figura 1.5 – Principais mecanismos de morte celular: apoptose e necrose (Adaptado de Gewies, 2003).....	7
Figura 1.6 – Representação das vias extrínseca e intrínseca da apoptose (Adaptado de Wong, 2011).....	9
Figura 1.7 – Representação das diversas fases que constituem o ciclo celular (Adaptado de Sandal, 2002).	11
Figura 1.8 – Estrutura química do composto $[Cu(H_2O)(DMSO)(ph-tpy)](NO_3)_2$, denominado ZM V, que apresenta três ligandos: a água, o DMSO e o ph-tpy (ou 4'-fenil-2,2':6',2''-terpiridina).....	19
Figura 1.9 – Progressão de células do epitélio saudável a carcinoma colorectal (Adaptado de Chu, 2008).....	20
Figura 1.10 – Principais fases do desenvolvimento do carcinoma hepatocelular humano (Adaptado de Thorgeirsson e Grisham, 2002).	21
Figura 1.11 – Modelo do processo de carcinogénese do cancro da mama (Beckmann <i>et al.</i> , 1997) (Adaptado de Polyak, 2001).	23
Figura 3.1 – Viabilidade celular das linhas tumorais HCT116, HepG2 e MCF-7 após exposição de 48 h ao composto ZM V.	44
Figura 3.2 - Viabilidade celular das linhas não-tumorais de a) fibroblastos e b) MCF-10A após exposição de 48 h ao composto ZM V.	45
Figura 3.3 – Indução da apoptose pelo ZM V em células tumorais HCT116 após incubação de 24 h, posteriormente marcadas com a sonda Hoechst 33258 e visualizadas por microscopia de fluorescência.	47
Figura 3.4 - Indução da apoptose pelo ZM V em células tumorais HepG2 após incubação de 24 h, marcadas com a sonda Hoechst 33258 e visualizadas por microscopia de fluorescência.	48
Figura 3.5 – Ensaio de citometria de fluxo com dupla marcação com Anexina V-FITC e IP para células tumorais HCT116 incubadas durante 48 h com 0,1 % (v/v) de DMSO (Controlo) ou com ZM V nas concentrações de 0,05 e 0,1 μ M.	50
Figura 3.6 – Níveis de expressão de genes apoptóticos <i>BCL-2</i> , <i>BAX</i> , <i>CASP3</i> em células HCT116 incubadas com 0,1 % (v/v) de DMSO (controlo) ou 0,05 μ M de ZM V durante 3, 6, 9 e 12 h.	51
Figura 3.7 – Distribuição das células pelas diversas fases do ciclo celular.	53
Figura 3.8 – Representação gráfica da percentagem de células HCT116 presente em cada fase do ciclo celular, após incubações de 8 e 24 h com 0,1 % (v/v) de DMSO (amostra controlo) ou 0,05 μ M de ZM V.	54
Figura 3.9 – Variação da absorvância do composto ZM V na ausência (linha a preto) e na presença de concentrações crescentes de CT-DNA (0 a 27 μ M) (linhas a cinza, estando a maior concentração de DNA representada pela linha vermelha).	56

Figura 3.10 – Efeito da incubação de 200 ng de DNA plasmídico pBSK II com DMSO (amostra controlo) e com diferentes concentrações de composto ZM V (5, 10, 25, 50, 75 e 100 μ M).	58
Figura 3.11 – Efeito da incubação de pBSK II com 10 e 50 μ M de ZM V durante diferentes períodos de tempo (1, 5, 20, 24 e 48 h) a 37 °C em tampão 5 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 7,2.	59
Figura 3.12 – Distinção visual entre cometas com diferentes níveis de danos.	60
Figura 3.13 – Distribuição do nível de danos apresentado por células HCT116 incubadas na ausência de composto e DMSO (controlo) ou na presença de 0,1 % (v/v) de DMSO, 0,1 μ M de ZM V ou 0,05 % (v/v) de H ₂ O ₂	61
Figura 3.14 – Representação gráfica da média de percentagem de DNA na cauda do cometa para cada uma das condições estudadas em células tumorais HCT116: controlo negativo, 0,1 % (v/v) de DMSO, 0,1 μ M de ZM V e 0,05 % (v/v) de H ₂ O ₂	62
Figura 3.15 – Géis resultantes de electroforese bidimensional de extractos proteicos de células tumorais HCT116 incubadas com (A) 0,15 % (v/v) de DMSO ou (B) 0,07 μ M de ZM V durante 24 h.	63
Figura 3.16 – Variação da absorvância a 340 nm do composto GS-DNB ao longo do tempo.	70
Figura 3.17 – Concentração de complexo MDA-TBA ₂ presente em cada amostra.	72

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 – Propriedades do composto metálico de cobre, ZM V.	25
Tabela 2.2 – Sequências de <i>primers forward</i> e <i>reverse</i> e tamanho do amplicão esperado.	30
Tabela 2.3 – Temperatura de <i>annealing</i> e concentrações utilizadas de <i>primers forward</i> e <i>reverse</i> para amplificação dos genes <i>rRNA18S5</i> , <i>BAX</i> , <i>BCL-2</i> e <i>CASP3</i>	31
Tabela 2.4 – Condições reacionais utilizadas para a reacção de RT-PCR para os genes <i>rRNA18S5</i> , <i>BAX</i> , <i>BCL-2</i> e <i>CASP3</i>	31
Tabela 2.5 – Programa utilizado na focagem isoelectrica.	39
Tabela 3.1 – Percentagem de células viáveis, células apoptóticas iniciais e tardias e células necróticas após incubação de células HCT116 com 0,1 % (v/v) de DMSO (Controlo) ou com 0,05 e 0,1 µM de ZM V.	50
Tabela 3.2 – Proteínas identificadas nos géis resultantes da electroforese bidimensional com identificação do ponto isoelectrico (pI), massa molecular (MM) e variação da expressão relativamente ao controlo, cujos valores resultam da média de três ensaios independentes.	63

LISTA DE ABREVIATURAS

5-FU	5-fluorouracil
Abs	Absorvância
Abs₂₆₀/Abs₂₃₀	Razão entre a absorvância medida a 260 nm e a absorvância a 230 nm
Abs₂₆₀/Abs₂₈₀	Razão entre a absorvância medida a 260 nm e a absorvância a 280 nm
AFB1	Aflotoxina B ₁
Apaf-1	<i>Apoptosis protease activating factor-1</i>
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
APS	Persulfato de amônio, do inglês <i>Ammonium Persulfate</i>
ATP	5'-trifosfato de adenosina, do inglês <i>Adenosine-5'-triphosphate</i>
BAX	Gene que codifica para a proteína pro-apoptótica Bax, da família Bcl-2
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
BCL-2	Gene que codifica para a proteína anti-apoptótica Bcl-2, da família Bcl-2
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma protein 2</i>
Bid	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
Bis	N',N' - Metileno – Bisacrilamida, do inglês <i>N,N'-Methylenebisacrylamide</i>
BRCA1	<i>Breast cancer 1 susceptibility gene</i>
BRCA2	<i>Breast cancer 2 susceptibility gene</i>
BSA	Albumina do Soro Bovino, do inglês <i>Bovine Serum Albumin</i>
Ca²⁺	Di-catão de cálcio
CASP3	Gene que codifica para a protease de cisteína caspase-3
Caspase	Protease de cisteína, do inglês <i>Cysteine-aspartic protease</i>
CCR	Carcinoma colorrectal
Cdk	<i>Cyclin-dependent kinases</i>
cDNA	DNA complementar, do inglês <i>complementar DNA</i>
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CHC	Carcinoma hepatocelular
CO₂	Dióxido de carbono
CT-DNA	DNA de timo de bezerro, do inglês <i>Calf Thymus-DNA</i>
Cu	Átomo de Cobre
DISC	<i>Death inducing signaling complex</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Sulfóxido de dimetilo, do inglês <i>Dimethyl Sulfoxide</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
Dnase	Desoxirribonuclease
DOX	Doxorrubicina

DTT	Ditiotreitol
E2F	Factor de transcrição E2, do inglês <i>E2 transcription factor</i>
EGF	Factor de crescimento epidérmico, do inglês <i>Epidermal growth factor</i>
EMSA	Ensaio de Retardamento da Mobilidade Electroforética, do inglês <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
ER	Receptor de estrogénio, do inglês <i>Estrogen receptor</i>
FADD	<i>Fas-associated death domain</i>
FAP	Polipose adenomatosa familiar, do inglês <i>Familiar adenomatous polyposis</i>
FasL	<i>Fatty acid synthetase ligand</i>
FasR	<i>Fatty acid synthetase receptor</i>
FBS	Soro Fetal Bovino, do inglês <i>Fetal Bovine Serum</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína, do inglês <i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
G	Guanina
GSH	Glutathiona reduzida
GST	Glutathiona S-transferase
H₂O₂	Peróxido de hidrogénio
HBV	Vírus da hepatite B, do inglês <i>Hepatitis B virus</i>
HCT116	Linha celular do carcinoma colorectal humano
HCV	Vírus da hepatite C, do inglês <i>Hepatitis C virus</i>
HepG2	Linha celular do carcinoma hepatocelular humano
HER	<i>Human epidermal growth factor receptor-2</i>
HER2	Gene que codifica para o receptor membranar HER
HMPA	Agarose de elevado ponto de fusão, do inglês <i>High melting point agarose</i>
HNPCC	<i>Hereditary nonpolyposis colorectal cancer</i>
IAP	<i>Inhibitory of apoptosis proteins</i>
IC₅₀	Concentração de composto inibitória de 50 % da viabilidade celular, do inglês <i>Inhibitory Concentration</i>
IP	Iodeto de Propídio, do inglês <i>Propidium Iodide</i>
Kb	Constante de afinidade para o DNA
KCl	Cloreto de potássio
LMPA	Agarose de baixo ponto de fusão, do inglês <i>Low melting point agarose</i>
LV	Leucovorina
MCF-7	Linha celular do adenocarcinoma da mama
MCF-10A	Linha celular saudável de células da glândula mamária
MDA	Malondialdeído
mRNA	RNA mensageiro
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio
Nº	Número

NaCl	Cloreto de sódio
Omi/HtrA2	<i>Omi/high temperature requirement protein A</i>
PBS	Tampão de Fosfato Salino, do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i>
pBSKII	DNA plasmídico pBluescript II SK+
pH	Potencial de Hidrogénico iónico
ph-tpy	4'-fenil-2,2':6',2''-terpiridina, do inglês <i>4'-phenyl-2,2':6',2''-terpyridine</i>
PMS	Metossulfato de fenazina, do inglês <i>Phenazine Methosulphate</i>
PMSF	Flureto de fenilmetilsulfonilo, do inglês <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
PR	Receptor de progesterona, do inglês <i>progesterone receptor</i>
Rb	Proteína do retinoblastoma, do inglês <i>Retinoblastoma</i>
RNA	Ácido Ribonucleico, do inglês <i>Ribonucleic Acid</i>
ROS	Espécies Reactivas de Oxigénio, do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i>
rRNA18S5	Gene que codifica para o RNA ribossomal 18S
RT-PCR	Transcritase reversa – reação em cadeia da polimerase, do inglês <i>Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Electroforese em gel de poliacrilamida – Dodecil sulfato de sódio
SMAC/DIABLO	<i>Second mitochondria-derived activator of caspase/Direct IAP-binding protein with low pI</i>
TAE	Tampão Tris-Acetado-EDTA
TBA	Ácido tiobarbitúrico, do inglês <i>thiobarbituric acid</i>
TBARS	Especies reactivas ao ácido tiobarbitúrico, do inglês <i>thiobarbituric acid reactive species</i>
TEMED	N,N,N',N' - tetrametiletilenodiamina
TNF	Factor de necrose tumoral, do inglês <i>Tumor necrosis factor</i>
TNFR1	Receptor do factor de necrose tumoral, do inglês <i>Tumor necrosis factor receptor 1</i>
TOPO II	Topoisomerase II
TP53	Gene supressor de tumores que codifica para a proteína p53
TRADD	<i>TNF receptor-associated death domain</i>
Tris-HCl	Tris-Hidroclorito
UV	Ultravioleta
Vol	Volume
ZM V	Complexo de cobre [Cu(H ₂ O)(DMSO)(4'-fenil-2,2':6',2''-terpiridina)](NO ₃) ₂

LISTA DE UNIDADES

% (p/v)	Porcentagem peso/volume
% (v/v)	Porcentagem volume/volume
A; mA	Amperes; miliamperes
H; min; s	Horas; minutos; segundos
kDa; Da	KiloDalton; Dalton (10^{-3} kg)
Kg; g; mg; μ g	Quilogramas; grama (10^{-3} kg); miligrama (10^{-6} kg); micrograma (10^{-9} kg); ng – nanograma (10^{-12} kg)
L; mL; μ L	Litro; mililitro (10^{-3} L); μ L – microlitro (10^{-6} L)
m; cm; mm; nm	Metro; centímetro (10^{-2} m); milímetro (10^{-3} m); nanómetro (10^{-9} m)
M; mM; μ M	Molar (mol/L); milimolar (10^{-3} M); micromolar (10^{-6} M)
mol; pmol	Mole; picomole
°C	Graus Celcius
pb	Pares de bases
rpm	Rotações por minuto
U	Unidade; mU – miliunidade
UA	Unidade de absorvância
V	Volts
W	Watts

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
[complexo]	Concentração de complexo
[DNA]	Concentração de DNA
Σ	Somatório
ϵ	Coefficiente de extinção molar
ϵ_a	Coefficiente de extinção molar aparente
ϵ_b	Coefficiente de extinção molar do composto ligado ao DNA
ϵ_f	Coefficiente de extinção molar do composto no estado livre
λ	Comprimento de onda
ℓ	Percurso óptico

1. INTRODUÇÃO

1.1. INCIDÊNCIA E MORTALIDADE NO CANCRO

O cancro é a principal causa de morte em países desenvolvidos e a segunda em países em vias de desenvolvimento, sendo estimada mundialmente para 2008 a ocorrência de 12,7 milhões de novos casos e 7,6 milhões de mortes causadas por esta doença (WHO, 2012; ACS, 2011; Jemal *et al.*, 2011). Para 2030 prevê-se 21,4 milhões de novos casos e 13,2 milhões de mortes por cancro, tendo em conta o aumento da população e o seu envelhecimento (ACS, 2011). A adopção de estilos de vida pouco saudáveis, incluindo o tabagismo, hábitos alimentares incorrectos, sedentarismo e o consumo de álcool, também contribuem para o aumento do risco de desenvolvimento desta doença (ACS, 2011).

A nível mundial, os principais cancros diagnosticados nos homens foram o cancro do pulmão, próstata e colorectal, enquanto para as mulheres foram o cancro da mama, colorectal e colo do útero (Figura 1.1) (WHO, 2012; ACS, 2011; Jemal *et al.*, 2011).

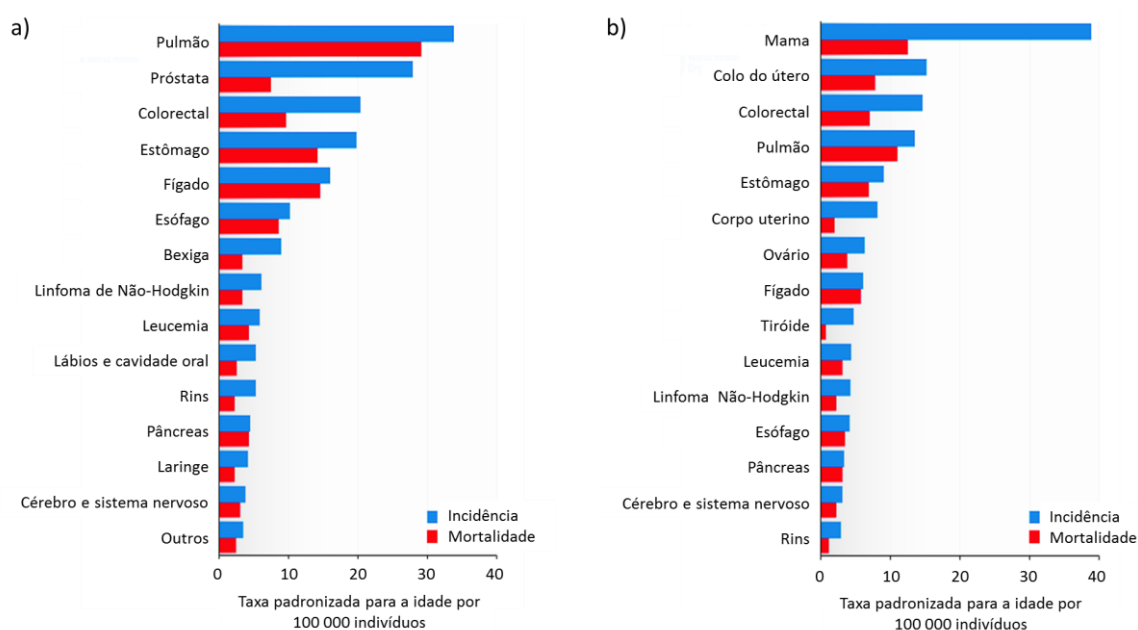


Figura 1.1 – Tipos de cancro mais comuns a nível mundial para **a)** sexo masculino e **b)** sexo feminino. Os dados são referentes ao número de novos casos ou mortes por cancro em 100000 pessoas por ano, tendo em conta uma idade padrão (Adaptado de GLOBOCAN, 2008).

Em 2008, os cancros mais comuns em Portugal foram o da próstata, colorectal e pulmão para os homens, e os cancros da mama, colorectal e colo do útero para as mulheres. Nesse ano observou-se, para ambos os sexos, uma incidência de 16,1 % para o cancro colorectal, 12,3 % para o cancro da mama, 11,9 % para o cancro da próstata e 7,6 % para o cancro do pulmão (Figura 1.2) (GLOBOCAN, 2008).

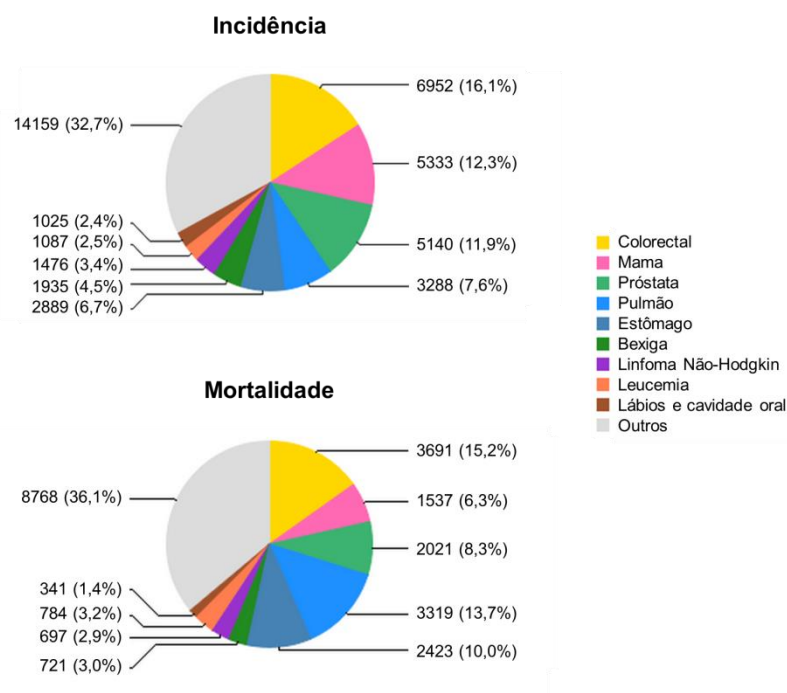


Figura 1.2 – Estimativas de incidência e mortalidade dos cancros mais comuns em Portugal (Adaptado de GLOBOCAN, 2008).

As estimativas de incidência e mortalidade referidas anteriormente associadas às perspectivas de aumento de incidência e do número de mortes por cancro para 2030 (ACS, 2011), dá-nos uma indicação da premente necessidade de uma contínua investigação sobre terapias mais efectivas ou novas abordagens terapêuticas, de forma a serem reduzidas estas estimativas e promover um aumento da esperança de vida dos indivíduos com cancro.

1.2. TUMORIGÉNESE

O cancro apresenta-se como um conjunto de doenças complexas caracterizadas principalmente pelo crescimento descontrolado de células, resultante da elevada capacidade de mutagenicidade (Luo *et al.*, 2009; Bunz, 2008; Hanahan e Weinberg, 2000).

As causas que se encontram na base da origem do processo de tumorigénese podem ser divididas em dois grupos: os factores externos ou ambientais, como por exemplo o tabagismo, o consumo de álcool, a dieta alimentar incorrecta, o sedentarismo e a exposição a agentes químicos, organismos infecciosos, radiação e condições de *stress*; e os factores internos, relacionados com mutações hereditárias e alterações hormonais e imunitárias (ACS, 2011; Herceg, 2007). Contudo, os principais factores envolvidos no desencadear da tumorigénese são as mutações promovidas pelos factores ambientais, contabilizando para 90 a 95 % de todos os cancros (Anand *et al.*, 2008). Estas principais alterações constam de mutações somáticas e uma considerável instabilidade genómica (Sandal, 2002; Hanahan e Weinberg,

2000). A instabilidade genómica é uma característica de quase todos os cancros, definindo-se pela tendência do genoma em adquirir consecutivas mutações (Negrini *et al.*, 2010; Malumbres e Barbacid, 2009). A ocorrência de erros nos mecanismos de reparação do DNA, o silenciamento de genes supressores de tumores (mutações de perda de função) e a activação de oncogenes (mutações de ganho de função) são algumas das alterações que favorecem o desenvolvimento do cancro. Os mecanismos epigenéticos, tais como metilação do DNA e modificações de histonas também se sabe contribuírem para a tumorigénese (Herceg, 2007). De facto, a inactivação de alguns genes contribui para a incapacidade de reparação dos danos no DNA, o que provoca um aumento das taxas de mutações e, como consequência, um acumular de mutações à medida que o tumor progride (Sandal, 2002; Hanahan e Weinberg, 2000). A instabilidade genómica engloba ainda a instabilidade cromossómica que provoca uma alteração no número de cromossomas da célula, como resultado de defeitos na segregação cromossómica da mitose (Malumbres e Barbacid, 2009; Aguilera e Gomez-Gonzalez, 2008).

Como referido, a tumorigénese resulta de múltiplos processos que levam à transformação de uma célula saudável numa célula tumoral e, posteriormente, ao crescimento do tumor a partir desta célula (Luo *et al.*, 2009; Bunz, 2008; Hanahan e Weinberg, 2000). O processo tumorigénico pode ser dividido em três fases essenciais: a iniciação, a promoção e a progressão (Figura 1.3). A iniciação tem início com a ocorrência de danos no DNA que evoluem para mutações genéticas como resultado da falta de reparação dos mesmos. Essas mutações podem, por vezes, atribuir uma vantagem selectiva quer seja através do aumento da proliferação celular quer da redução da morte celular (Jakóbisiak *et al.*, 2003; Hursting *et al.*, 1999). A fase da promoção é o processo que leva à expansão clonal dessa célula formando células pré-neoplásicas capazes de produzir nódulos, pólipos ou papilomas (Jakóbisiak *et al.*, 2003). A progressão tumoral consiste na transformação das células pré-neoplásicas em células tumorais através de uma instabilidade genómica promovida pela contínua ocorrência de mutações nestas células (Hursting *et al.*, 1999). Os tumores podem ser benignos ou malignos, sendo que os primeiros não apresentam características invasivas nem malignas e os segundos têm a capacidade de invadir os tecidos circundantes, podendo atingir vasos sanguíneos ou linfáticos e levar à formação de metástases nos mesmos, o que por seu lado constitui uma característica maligna e letal (Bunz, 2008; Hursting *et al.*, 1999).

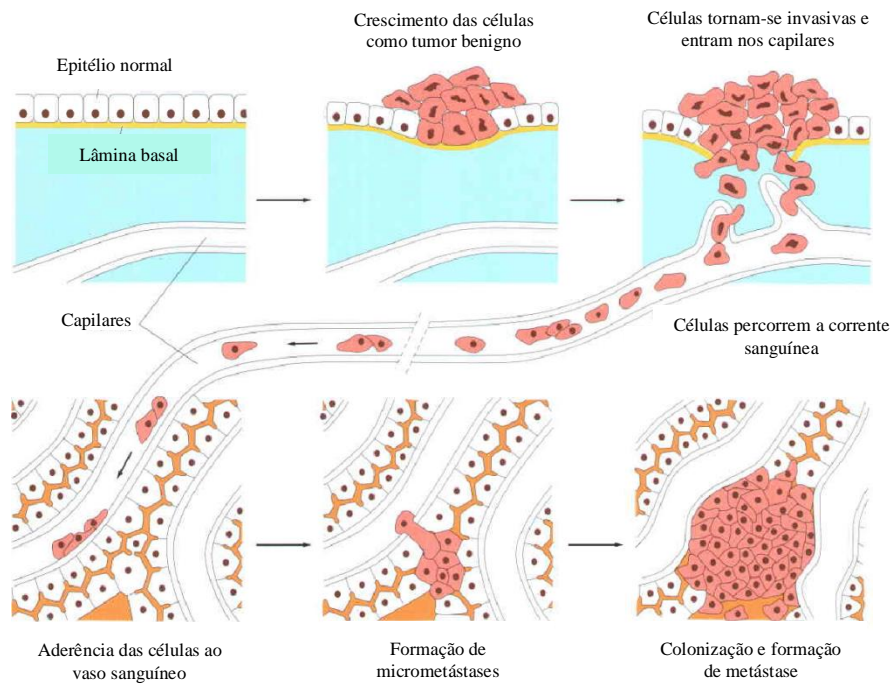


Figura 1.3 – Esquema representativo do processo multifásico da tumorigênese. Alterações nas células de epitélio são mantidas no genoma como mutações, conferindo uma vantagem proliferativa e de sobrevivência, que culmina na sua transformação em células tumorais. A proliferação descontrolada destas células de características malignas de invasão e metastização são promovidas pela contínua aquisição de novas mutações (Adaptado de Alberts *et al.*, 2008).

As células cancerígenas apresentam um conjunto de características comuns entre si: auto-suficiência de factores de crescimento, insensibilidade aos sinais inibidores de crescimento, evasão à apoptose, imortalização (replicação ilimitada), indução da angiogénese e capacidade de invasão e de promoção de metástases (Figura 1.4) (Hanahan e Weinberg, 2011, 2000).

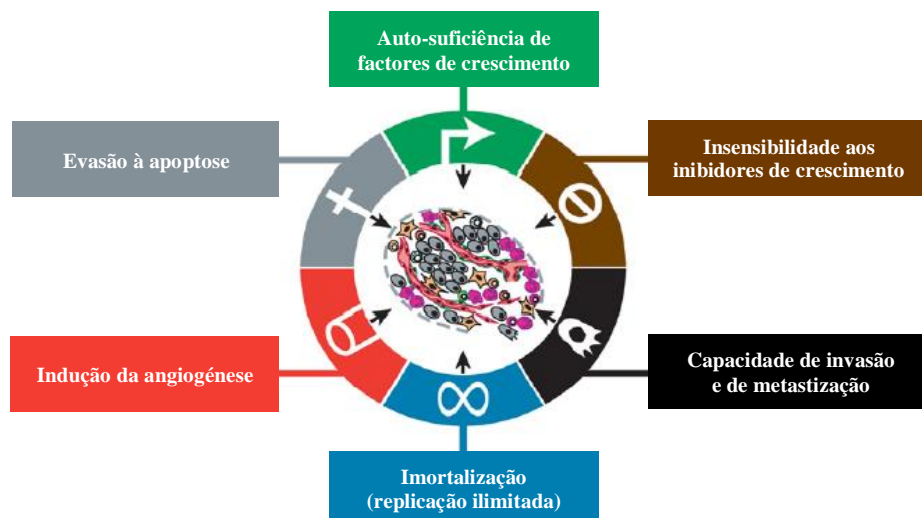


Figura 1.4 – Representação das seis principais características adquiridas pelas células durante o processo de tumorigênese (Adaptado de Hanahan e Weinberg, 2000).

Para a proliferação de células saudáveis são requeridos sinais de crescimento provenientes de células do tecido circundante (Abbott *et al.*, 2006; Hanahan e Weinberg, 2000). Contrariamente, a proliferação de células tumorais ocorre independentemente da existência destes sinais, podendo ser devida à sobre-expressão de receptores transmembranares e a uma hipersensibilidade aos sinais de crescimento, ou à presença de oncogenes que mimetizam os sinais de crescimento normais e levam à proliferação celular (Hanahan e Weinberg, 2000). Associada a esta contínua proliferação, as células tumorais adquirem ainda uma insensibilidade a inibidores do crescimento celular (Hanahan e Weinberg, 2011, 2000). Em tecidos normais, a homeostasia celular é mantida através de sinais anti-proliferativos promovidos por inibidores de crescimento que promovem a entrada das células em G0 ou então a perda permanentemente do seu potencial proliferativo (Hanahan e Weinberg, 2000). A proteína Rb (do inglês, *retinoblastoma*) é central nesta via ao permitir ou bloquear a progressão do ciclo celular, nomeadamente entre as fases G1 e S (Hanahan e Weinberg, 2011; Nevins, 2001; Hanahan e Weinberg, 2000). Uma célula tumoral com danos nesta proteína torna-se insensível aos sinais anti-proliferativos, permanecendo assim em contínua proliferação (Hanahan e Weinberg, 2011, 2000; Weinberg, 1995).

A resistência à apoptose é em grande parte conseguida pelo aumento da expressão de reguladores anti-apoptóticos ou redução da expressão de factores pró-apoptóticos (Debatin e Krammer, 2004). Contudo, a causa mais frequente de evasão ao processo apoptótico consiste na perda de função da proteína p53, um supressor de tumores que identifica danos no DNA, tais como quebras em cadeia dupla ou simples, e como consequência desencadeia o processo de apoptose (Abbott *et al.*, 2006).

As células tumorais adquirem ainda a capacidade de se replicarem de forma ilimitada, contrariando o número limitado de divisões celulares e ciclos de crescimento de células saudáveis (Hanahan e Weinberg, 2011). Esta contínua replicação ocorre normalmente com a imortalização destas células, como consequência do aumento da expressão/actividade da enzima telomerase, que mantém intactas as extremidades dos cromossomas, os telómeros, envolvidos na manutenção da estabilidade cromossómica (Hanahan e Weinberg, 2011; Hahn *et al.*, 1999).

O processo de angiogénese, isto é, a formação de novos vasos sanguíneos, é activado em tumores de forma a permitir que todas as células estejam próximas dos capilares e adquiram assim o oxigénio e os nutrientes essenciais para a sua sobrevivência e eliminem os desperdícios metabólicos e o dióxido de carbono (Bergers e Benjamin, 2003; Hanahan e Weinberg, 2000). A angiogénese pode ocorrer em qualquer fase do processo tumoral e é o resultado do desequilíbrio entre indutores e inibidores de angiogénese (Cook e Figg, 2010; Hanahan e Weinberg, 2000).

A capacidade de invasão e metastização permite que células tumorais disseminem do tumor primário e colonizem tecidos distantes do local de origem (Hanahan e Weinberg, 2000). As metástases são a causa de cerca de 90 % das mortes por cancro em humanos, uma vez que tratamentos como a cirurgia e a radioterapia não combatem eficazmente este problema (Abbott *et al.*, 2006). As proteínas CAM (do inglês, *cell-cell adhesion molecules*) estão divididas em quatro famílias: caderinas, imunoglobulinas, integrinas e selectinas, estando todas

associadas a interações entre células (Craig e Brady-Kalnay, 2011; Hanahan e Weinberg, 2000). A E-caderina, uma proteína transmembranar de adesão entre células, é responsável pela transmissão de sinais inibidores do crescimento entre células adjacentes, e como tal, a sua inactivação (observada na maioria dos cancros epiteliais) leva à aquisição das características de invasão e metastização (Dalmay e Edwards, 2006; Hanahan e Weinberg, 2000). As integrinas ligam as células ao substrato da matriz extracelular e também se encontram modificadas em células tumorais alterando a sua capacidade de adesão e permitindo que se tornem invasivas e que formem metástases (Desgrosellier e Cheresch, 2010; Hanahan e Weinberg, 2000).

1.3. MORTE CELULAR

Os dois principais mecanismos de morte celular são a apoptose e a necrose (Figura 1.5). A apoptose é um processo inerente a todas as células, sendo reconhecido como um mecanismo de morte celular programada pelo qual células que apresentem danos ou que não sejam necessárias são eliminadas promovendo assim a manutenção da homeostasia dos tecidos (Igney e Krammer, 2002; Kam e Ferch, 2000; Guénal *et al.*, 1997). A apoptose é iniciada quer por estímulos internos assim como externos que por sua vez induzem o “suicídio” programado da célula através da activação de genes apoptóticos (Ghobrial *et al.*, 2005). Na necrose, a morte celular é causada por danos externos, geralmente de maior gravidade ou de maior extensão (Ghobrial *et al.*, 2005). Embora a necrose seja considerada um processo geneticamente não regulado, alguns autores defendem que é de facto um processo programado, como consequência da activação de cascatas de transdução de sinal específicas, independentes de caspases (Golstein e Kroemer, 2007). Este processo de morte celular é caracterizado pelo aumento do volume celular bem como do volume dos organelos, perda da integridade membranar e completa disrupção da célula, ou seja, libertação do conteúdo celular no meio extracelular, com o consequente desencadeamento de uma forte resposta inflamatória, que promove danos nas células do tecido circundante, sendo por isso considerado um processo tóxico (Elmore, 2007; Gewies, 2003; Kam e Ferch, 2000). Um ambiente inflamatório por seu lado pode constituir um factor importante para o desenvolvimento de tumores (Hanahan e Weinberg, 2011).

A homeostasia celular é mantida pelo equilíbrio entre os processos de divisão e morte celular (Portt *et al.*, 2011; Wong, 2011). Ambos os processos desempenham importantes papéis fisiológicos na embriogénese, no normal desenvolvimento de tecidos e na resposta imunitária. Assim, um desequilíbrio entre ambos os mecanismos pode levar a um crescimento celular descontrolado, como consequência da falta de sinais apoptóticos, e assim culminar no desenvolvimento de várias doenças como o cancro, as doenças auto-imunes e as infecções virais (Kepp *et al.*, 2011; Khosravi-Far e Esposti, 2004; Gewies, 2003; Kanduc *et al.*, 2002). Alterações na via apoptótica, tais como o decréscimo da regulação de proteínas pró-apoptóticas ou a sua mutação e ainda o aumento da expressão ou da actividade de proteínas anti-apoptóticas, apresentam-se como algumas das muitas causas da resistência das células tumorais à apoptose induzida por agentes terapêuticos (Gewies, 2003; Igney e Krammer, 2002).

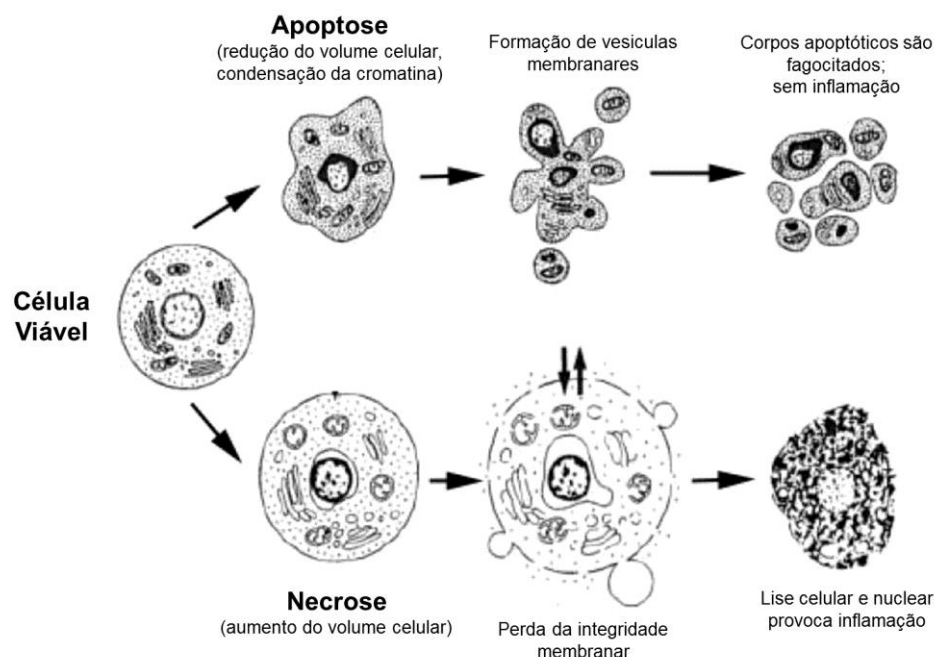


Figura 1.5 – Principais mecanismos de morte celular: apoptose e necrose. O processo apoptótico é contido e inicia-se com a condensação da cromatina e redução do volume celular, formação de vesículas membranares para a formação dos corpos apoptóticos, os quais são fagocitados. A necrose é caracterizada por um aumento do volume da célula, perda da integridade membranar com consequente liberação do conteúdo celular provocando uma resposta inflamatória (Adaptado de Gewies, 2003).

A evasão do processo apoptótico que contribui igualmente para a progressão tumoral, é vista desde há muito, como um alvo de tratamento para esta doença, por exemplo, ao recorrer a agentes quimioterapêuticos capazes de restaurar este processo e induzir a morte celular de células tumorais (Wong, 2011; Ghobrial *et al.*, 2005). Estes agentes podem ter como alvo diversas proteínas envolvidas no processo apoptótico quer estejam envolvidas na via extrínseca, via intrínseca, caspases ou proteínas responsáveis pela regulação da apoptose (Ghobrial *et al.*, 2005).

1.3.1. APOPTOSE

Uma célula apoptótica apresenta uma morfologia bastante distinta comparativamente a uma célula viável, sendo que o processo apoptótico afecta tanto o núcleo como o citoplasma, e as alterações promovidas são similares entre células, independentemente do tipo celular (Wong, 2011). Essas alterações morfológicas descrevem-se inicialmente por uma redução do volume celular e condensação da cromatina (processo denominado picnose), seguida pela promoção de alterações na membrana celular e, posteriormente, pela fragmentação nuclear (cariorrhexis), seguindo-se a formação de corpos apoptóticos (vesículas constituídas por citoplasma e organelos podendo ou não conter fragmentos nucleares) (Kepp *et al.*, 2011; Wong, 2011; Elmore, 2007). A nível bioquímico decorrem diversas alterações, tais como,

activação das caspases (proteases de cisteína), fragmentação do DNA, clivagem de diversas proteínas e alterações da membrana celular (Wong, 2011). Por fim, os corpos apoptóticos são reconhecidos por células fagocitárias e são então eliminados, sem ser desencadeada uma resposta inflamatória (Wong, 2011; Edinger e Thompson, 2004; Khosravi-Far e Esposti, 2004; Gewies, 2003).

No mecanismo apoptótico, as caspases apresentam dois papéis fundamentais: o de iniciadores (caspases 2, 8, 9 e 10) e o de efectores (caspases 3, 6 e 7) (Kepp *et al.*, 2011; Elmore, 2007). As caspases são sintetizadas como zimogénios (pró-caspases), e portanto encontram-se inactivas (Elmore, 2007). Algumas caspases possuem a capacidade de se agregarem e auto-activarem, como ocorre com as caspases iniciadoras (Ashkenazi e Herbst, 2008; Elmore, 2007; Debatin e Krammer, 2004). Contrariamente, as caspases efectoras necessitam de um processo de activação levado a cabo por caspases iniciadoras, mediante a clivagem proteolítica de resíduos de aspartato específicos (Elmore, 2007; Shi, 2002). A activação das caspases é um passo decisivo no desencadeamento da apoptose, levando à clivagem de proteínas vitais, do invólucro nuclear e do citoesqueleto, e apresentando ainda a capacidade de activar DNases que degradam o DNA nuclear (Wong, 2011). A caspase 3, uma caspase efectora, é responsável pela clivagem de diversos componentes celulares, desde cinases, proteínas do citoesqueleto e de reparação do DNA, afectando assim o citoesqueleto, o ciclo celular e vias de sinalização, o que por fim leva às alterações morfológicas típicas da apoptose referidas anteriormente (Wong, 2011; Elmore, 2007). O processo apoptótico apresenta duas vias pelas quais pode ocorrer: a via intrínseca ou mitocondrial e a via extrínseca ou de receptor de morte celular, as quais se encontram esquematizadas na Figura 1.6 (Wong, 2011).

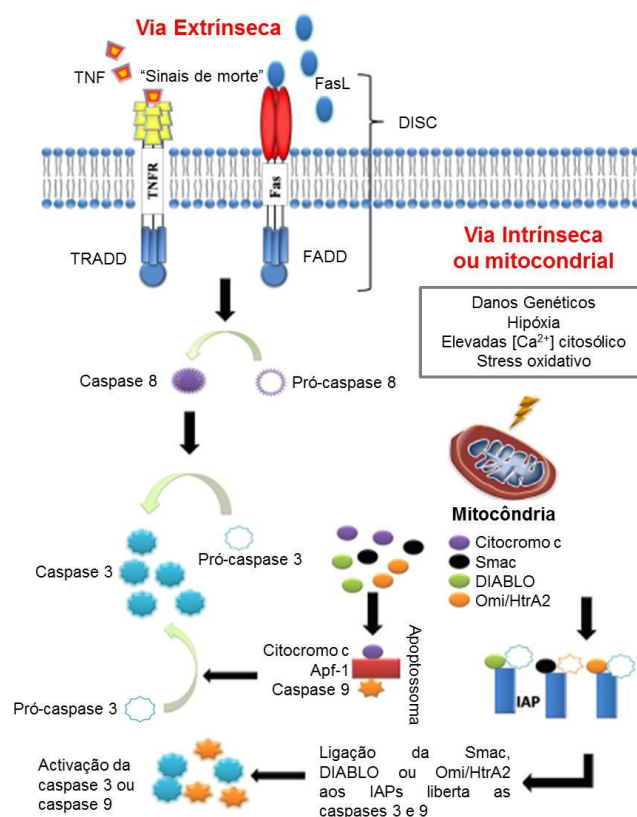


Figura 1.6 – Representação das vias extrínseca e intrínseca da apoptose. A via extrínseca é dependente da activação de receptores de morte celular, enquanto na via intrínseca a mitocôndria é o principal alvo celular com a libertação de proteínas pró-apoptóticas, e ambas culminam na activação da via de execução das caspases (Adaptado de Wong, 2011).

A via extrínseca inicia-se pela ligação dos ligandos TNF (do inglês, *tumor necrosis factor*) ou FasL (do inglês, *fatty acid synthetase ligand*), aos respectivos receptores de morte, TNFR1 (do inglês, *tumor necrosis factor receptor 1*) e FasR, que se encontram à superfície celular. Estes receptores têm domínios intracelulares que recrutam as proteínas adaptadoras TRADD (do inglês, *TNF receptor-associated death domain*) e FADD (do inglês, *Fas-associated death domain*), respectivamente, e ainda proteases, tais como a pró-caspase 8 (Portt *et al.*, 2011; Kam e Ferch, 2000). O complexo DISC (do inglês, *death inducing signaling complex*), formado pelo ligando, receptor e adaptador, activa a caspase iniciadora 8, que induz a apoptose clivando caspases efectoras, como a caspase 3 (Portt *et al.*, 2011; Wong, 2011; Elmore, 2007; Kaufmann e Earnshaw, 2000). A via extrínseca induz ainda a amplificação da apoptose pela via intrínseca através da proteína Bid (do inglês, *BH3 interacting domain death agonist*), pertencente à família de proteínas Bcl-2, que após ser activada pela caspase 8, promove a activação da proteína Bax (do inglês, *Bcl-2-associated X protein*) (Festjens *et al.*, 2006; Ray *et al.*, 2005).

A via intrínseca tem por base eventos intracelulares que actuam directamente sobre a mitocôndria, os quais são desencadeados através de danos genéticos irreparáveis, hipóxia, elevadas concentrações de Ca^{2+} citosólico, stress oxidativo, assim como pela acção de agentes anti-tumorais (Wong, 2011). Estes estímulos aumentam a permeabilidade da mitocôndria,

levando à libertação de moléculas pró-apoptóticas para o citoplasma, tais como o citocromo c, Smac/DIABLO (do inglês, *second mitochondrial-derived activator of caspase/direct IAP-binding protein with low pI*) e Omi/HtrA2 (do inglês, *Omi/high temperature requirement protein A*) (Khosravi-Far e Esposti, 2004). Estas proteínas são reguladas pela família de proteínas Bcl-2, que é composta por dois grupos: proteínas pró-apoptóticas (por exemplo Bax, Bak, Bad e Bcl-Xs) e proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-X_L, entre outras) (Ghobrial *et al.*, 2005). As proteínas anti-apoptóticas regulam a apoptose bloqueando a libertação de citocromo c enquanto as proteínas pró-apoptóticas estimulam essa libertação (Elmore, 2007; Ghobrial *et al.*, 2005). Desta forma, um aumento na expressão de Bcl-2 apresenta-se como uma causa de resistência à quimioterapia e radioterapia (Kam e Ferch, 2000). Por sua vez, uma diminuição da expressão desta proteína desencadeia a resposta apoptótica a compostos anti-tumorais (Ghobrial *et al.*, 2005). A proporção dos níveis citosólicos entre a proteína anti-apoptótica Bcl-2 e a proteína pró-apoptótica Bax indica o destino da célula, isto é, se esta entra em apoptose (níveis aumentados de Bax) ou sobrevive (níveis aumentados de Bcl-2) (Elmore, 2007; Danial e Korsmeyer, 2004).

A via mitocondrial é iniciada com a translocação e oligomerização da proteína Bax ao nível da membrana mitocondrial externa e consequentemente com a formação de canais que permitem a libertação de citocromo c (Dejean *et al.*, 2005; Danial e Korsmeyer, 2004). O citocromo c é indispensável para a activação da Apaf-1 (do inglês, *apoptosis protease activating factor-1*). Este complexo recruta a pró-caspase 9, formado assim o apoptossoma, que por sua vez promove a activação da caspase 9 que activa a caspase 3 (Kaufmann e Earnshaw, 2000). A Smac/DIABLO e a Omi/HtrA2 inibem a actividade das IAPs (do inglês, *inhibitory of apoptosis proteins*) e auxiliam na activação das caspases 9 e 3 (Elmore, 2007; Ghobrial *et al.*, 2005; Khosravi-Far e Esposti, 2004).

1.4. CICLO CELULAR

O ciclo celular é um processo altamente regulado e organizado que permite o crescimento celular, garante a replicação correcta do DNA e que os cromossomas sejam divididos equivalentemente entre as duas células resultantes da mitose (Sandal, 2002; Garrett, 2001). A elevada proliferação celular é uma das características das células cancerígenas, sendo desenvolvida, não só pela evasão aos mecanismos de morte celular mas também, através de danos em genes envolvidos na regulação do ciclo celular (Sandal, 2002).

O ciclo celular é dividido em quatro fases sequenciais: a fase G1, S, G2 e a mitose (Figura 1.7) (Garrett, 2001). A fase G1 destina-se ao crescimento celular e à preparação dos cromossomas para posterior replicação. Esta é seguida pela fase S que consiste na fase de replicação do DNA. A fase G2 é uma preparação para a entrada em mitose, que consiste na última fase do ciclo celular, e na qual ocorre a divisão de uma célula em duas células idênticas (Alberts *et al.*, 2004; Lodish *et al.*, 2004; Sandal, 2002). Entre a fase média e tardia de G1 existe um ponto de restrição (R) que verifica se a célula recebeu os sinais de crescimento necessários para continuar a progressão do ciclo celular de G1 para S (Garrett, 2001). Se a célula for privada dos sinais de crescimento necessários então entra em G0, uma fase de quiescência, em

que a célula sai reversivelmente do ciclo celular na fase G₁. Essa saída pode ser temporária, caso volte a receber os sinais de crescimento, ou permanente, quando as condições para a reentrada no ciclo celular não são adequadas (Lapenna e Giordano, 2009; Sandal, 2002; Garrett, 2001).

A fase S e a mitose apresentam-se como as fases mais importantes do ciclo celular, sendo que a replicação do DNA apenas deve ocorrer quando a mitose se encontra terminada, e a mitose apenas deve ter lugar quando a replicação do DNA foi finalizada sem erros (Garrett, 2001).

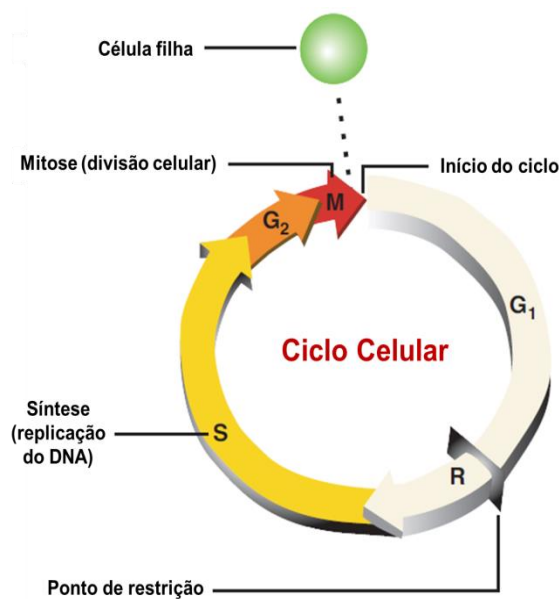


Figura 1.7 – Representação das diversas fases que constituem o ciclo celular. G₁ – crescimento e preparação dos cromossomos para replicação; S – síntese do DNA; G₂ – preparação para a mitose; Mitose – divisão celular (Adaptado de Sandal, 2002).

As fases G₁ e G₂ funcionam como pontos de controlo (*checkpoints*), nos quais a qualidade da célula é avaliada antes de entrar na fase S ou na mitose, respectivamente (Alberts *et al.*, 2004; Sandal, 2002). A passagem de G₁ para S é extremamente regulada pois é neste ponto que a célula se compromete a dividir e no qual é impossível reverter a progressão do ciclo (Sandal, 2002). Os principais pontos de controlo do ciclo celular ocorrem na transição entre as fases G₁/S e G₂/M, ambos importantes pontos de controlo de danos no DNA (Garrett, 2001). A integridade do DNA é verificada em todas as fases do ciclo celular de forma a prevenir a replicação de DNA com erros ou a incorrecta segregação de cromossomos (Blagosklonny e Pardee, 2002). A perda destes pontos de controlo tem consequências graves, uma vez que permite a acumulação de danos no DNA e origina instabilidade genómica e proliferação celular descontrolada, podendo então desencadear-se o processo de tumorigénese (Sandal, 2002).

A transição entre as diferentes fases do ciclo celular é dependente de reguladores específicos que apenas se encontram presentes de forma transiente (Lewin, 2004). Os reguladores do ciclo celular são proteínas cinases constituídas por duas subunidades: uma catalítica, denominada Cdk (do inglês, *cyclin-dependent kinases*), e outra regulatória, intitulada

de ciclina. A subunidade catalítica apresenta-se inactiva, mas quando ligada à ciclina sofre uma mudança conformacional devido à fosforilação/desfosforilação de resíduos específicos por parte da ciclina, tornando-se assim activa (Alberts *et al.*, 2004; Lewin, 2004; Lodish *et al.*, 2004). As ciclinas são expressas apenas em resposta a sinais de crescimento, alcançando níveis mais elevados em fases específicas do ciclo celular, não sendo portanto constantes ao longo do ciclo celular (Alberts *et al.*, 2004; Sandal, 2002). A degradação das ciclinas é essencial para provocar a inactivação das cinases correspondentes e assim controlar a proliferação celular (Lewin, 2004).

A fase G1 é iniciada com a proteína Rb na forma inactiva, em que esta se encontra desfosforilada e ligada ao factor de transcrição E2F, promovendo consequentemente a sua inibição (Weinberg, 1995). Nesta fase, a proteína Rb apresenta-se como um regulador principal, sendo o substrato dos complexos Cdk/ciclina (Lewin, 2004; Nevins, 2001). Alguns genes cujos produtos são essenciais para a fase S dependem da actividade de E2F e, desta forma, garante-se que a replicação do DNA não é iniciada prematuramente (Blagosklonny e Pardee, 2002; Sandal, 2002). Numa fase intermédia de G1, a fosforilação da proteína Rb é iniciada pelo complexo Cdk4/ciclina D e Cdk6/ciclina D (ciclinas D1, D2, D3), estimulando posteriormente numa fase G1 avançada, que o complexo Cdk2/ciclina E promova a contínua fosforilação de proteínas Rb, provocando a libertação dos factores de transcrição E2F (Lapenna e Giordano, 2009; Lodish *et al.*, 2004; Nevins, 2001). A fosforilação da proteína Rb pode ser considerado o ponto de restrição a partir do qual é impossível interromper a progressão para a fase S (Lapenna e Giordano, 2009). No desenvolvimento tumoral, a capacidade de ultrapassar este ponto de controlo é essencial para a contínua proliferação celular independente dos estímulos mitogénicos. De facto, a proteína Rb encontra-se muitas vezes mutada permanecendo no estado fosforilado e, portanto, incapaz de se ligar à E2F deixando de existir a restrição da fase S (Lapenna e Giordano, 2009; Sandal, 2002).

A fase mitótica também é dependente da activação/desactivação do complexo Cdk/ciclina, uma vez que as ciclinas sintetizadas continuamente durante a interfase são degradadas durante a mitose (Lewin, 2004). Primeiramente, a Cdk1 é activada pela ciclina A permitindo a transição da fase G2 para a mitose, seguindo-se a degradação da ciclina A após a fragmentação da membrana nuclear. Isto permite que a Cdk1 forme um complexo com a ciclina B, que é por sua vez necessário a progressão da mitose. Quando a divisão está completa a Cdk1 é desactivada através da degradação proteolítica da ciclina B permitindo assim a saída das células da fase mitótica e a entrada novamente na fase G1 para mais um ciclo de divisão (Lapenna e Giordano, 2009; Malumbres e Barbacid, 2009).

A regulação das Cdk e ciclinas no ciclo celular e a sua importância na formação de tumores levou a que estas proteínas fossem consideradas importantes alvos na terapia do cancro, estando alguns novos agentes em fase de testes clínicos (Sandal, 2002). O flavopiridol é um inibidor das Cdk1, 2 e 4, bloqueando a progressão do ciclo celular, promovendo a diferenciação e induzindo a apoptose em carcinomas gástricos, cancros da próstata e renal e linfoma de não-Hodgkin (Lapenna e Giordano, 2009; Sandal, 2002). A diaminopirimidina R547 e a pirazole-3-carboxamida AT-7519 também inibem a actividade das Cdk1, 2 e 4, sendo usados em tumores sólidos em fase avançada e em tumores metastizados, respectivamente (Lapenna e Giordano, 2009; Malumbres e Barbacid, 2009). Estes agentes terapêuticos

apresentam efeitos tóxicos em células saudáveis limitando a sua aplicação, contudo quando utilizados em regimes combinatórios com outros compostos citotóxicos podem apresentar diversas vantagens (Lapenna e Giordano, 2009).

1.5. PROTEÍNA SUPRESSORA DE TUMORES P53

A proteína p53, codificada pelo gene supressor de tumores *TP53*, é um dos supressores de tumores mais conhecidos e estudados, e o seu gene apresenta-se mutado em mais de 50 % dos cancros humanos por todo o mundo (Wong, 2011; Lewin, 2004).

A proteína p53 é considerada como uma “guardiã do genoma” (Wong, 2011). Células saudáveis apresentam baixos níveis de p53 que irão aumentar em casos de ocorrência de danos no DNA como consequência por exemplo da radiação (Lewin, 2004). Quando activada, a p53 pode desencadear dois tipos de processos: a paragem do ciclo celular ou a apoptose. A decisão entre um ou o outro mecanismo depende da fase do ciclo em que a célula se encontra e do tipo de danos ocorridos no DNA. A p53 activa as proteínas das vias de reparação e interrompe o ciclo celular no ponto de controlo G1/S através da activação da proteína p21, enquanto o erro é reparado. Uma vez não sendo possível a reparação do erro é desencadeada a apoptose e desta forma evita-se o crescimento celular descontrolado e logo a formação de tumores (Elmore, 2007; Lewin, 2004; Sandal, 2002).

O processo de apoptose induzido pela p53 é principalmente desencadeado pela via mitocondrial, contudo também a via extrínseca pode ser activada (Amaral *et al.*, 2010). A actividade de factor de transcrição consiste no principal mecanismo pelo qual a p53 induz o processo apoptótico (Amaral *et al.*, 2010). A p53 induz a transcrição de proteínas pró-apoptóticas que actuam ao nível da mitocôndria, (por exemplo, a Bax), bem como de receptores de membrana (por exemplo, o Fas) (Lewin, 2004; Kam e Ferch, 2000).

Contudo, são conhecidas outras vias de indução do processo apoptótico pela proteína p53 independentes da sua actividade como factor de transcrição. Estas vias actuam ao nível da mitocôndria e do citoplasma. Ao nível mitocondrial, a p53 actua directamente sobre a proteína Bax, promovendo a sua translocação e oligomerização para a mitocôndria. Por sua vez, a nível citoplasmático, a p53 é translocada para a membrana mitocondrial despoletando a translocação de Bax igualmente para a mitocôndria e a sua posterior oligomerização. Ambas as vias são então responsáveis por despoletar a via intrínseca da apoptose (Amaral *et al.*, 2010).

1.6. TRATAMENTO DO CANCRO

A terapêutica atribuída a cada paciente de cancro depende de vários factores individuais como por exemplo, características moleculares e patológicas do cancro, a sua localização, a extensão da doença e o estado de saúde em geral do paciente. Os tratamentos contra o cancro visam eliminar por completo as células cancerígenas, suprimindo os sinais necessários para a proliferação celular (Luqmani, 2005).

Existem diferentes tipos de tratamentos a serem adoptados contra o cancro e os mesmos podem ser aplicados individualmente ou em regimes combinatórios (Luqmani, 2005). Os mais comuns são a cirurgia, a radioterapia, a quimioterapia, a imunoterapia e a terapia hormonal (ACS, 2011; Luqmani, 2005). A cirurgia é utilizada frequentemente e apresenta elevada eficácia em cancros numa fase inicial (Luqmani, 2005). A radioterapia é muitas vezes utilizada em conjunto com a cirurgia e destina-se, como esta última, a tumores sólidos e localizados (Barcellos-Hoff *et al.*, 2005; Garcia-Barros *et al.*, 2003). Na quimioterapia recorre-se a agentes com efeitos citotóxicos relativamente a células cancerígenas, interrompendo o processo tumorigénico através de mecanismos como a apoptose (Luo *et al.*, 2009; Johnstone *et al.*, 2002). A quimioterapia é normalmente aplicada aquando do insucesso da cirurgia, principalmente em estados mais avançados de doença, como sendo os casos de metastização, dado ser considerada um tratamento sistémico (Gordon e Nelson, 2012; Chabner e Roberts, 2005; Kelsen *et al.*, 1998). De facto, a quimioterapia tem demonstrado capacidade em curar vários tumores avançados e ainda revelou ser eficiente no aumento da taxa de sobrevivência de pacientes com outros tipos de cancro (Gordon e Nelson, 2012).

Os agentes utilizados em quimioterapia podem ser de origem natural (extraídos de plantas) ou então sintéticos (Luqmani, 2005). Estes estão divididos em cinco classes com base no seu modo de acção: agentes radiomiméticos, agentes alquilantes mono ou bifuncionais, anti-metabolitos, inibidores da topoisomerase II (TOPO II) e inibidores de replicação (Helleday *et al.*, 2008; Meirrow e Nugent, 2001). Os agentes radiomiméticos induzem quebras em cadeia dupla na molécula de DNA impedindo a replicação do DNA através da activação dos pontos de controlo do ciclo celular (Helleday *et al.*, 2008). Os agentes alquilantes interferem também com o processo de replicação através de modificações químicas nas bases do DNA criadas pela ligação covalente de compostos ao DNA (formação de aductos) (Helleday *et al.*, 2008). Os anti-metabolitos interferem com o metabolismo ou formação de nucleótidos e afectam o processamento do RNA ribossomal e de transferência, o que tem consequências na síntese de DNA e no crescimento celular (Helleday *et al.*, 2008; Luqmani, 2005). Os inibidores da TOPO II bloqueiam a actividade catalítica desta enzima, que consiste na promoção de quebras transientes no DNA (Nitiss, 2009). Outros compostos formam um complexo com a TOPO II no momento da clivagem transiente criando quebras em cadeia dupla no DNA interferindo com a sua replicação (Nitiss, 2009; Helleday *et al.*, 2008). Os inibidores de replicação inibem a actividade da DNA polimerase interrompendo a progressão da replicação e provocam, indirectamente, quebras em cadeia dupla (Helleday *et al.*, 2008). Estes agentes quimioterapêuticos provocam graves danos no DNA que excedem a capacidade dos mecanismos de reparação da célula e induzem, assim a entrada das células em apoptose (Johnstone *et al.*, 2002; Herr, 2001).

Os mecanismos que promovem a proliferação celular excessiva das células tumorais são considerados excelentes alvos para os agentes quimioterapêuticos. Estes compostos apresentam capacidade de interferirem com moléculas ou processos envolvidos na replicação e expressão celular (Luqmani, 2005). Uma vez que estes processos ou moléculas alvo também estão presentes nas células saudáveis, a acção não especifica dos compostos em células tumorais resulta no aparecimento de efeitos secundários adversos (Luqmani, 2005). Assim, uma premissa importante seria os compostos anti-tumorais apresentarem uma citotoxicidade e especificidade elevada em células tumorais, impedindo a progressão tumoral com um efeito

mínimo em células saudáveis, diminuindo desta forma os efeitos secundários adversos (Johnstone *et al.*, 2002).

Os efeitos citotóxicos da maioria dos agentes usados actualmente são elevados e, como tal, este tipo de tratamento só deve ser aplicado por curtos períodos de tempo (Hanahan e Weinberg, 2011; Luqmani, 2005). Os efeitos secundários mais comuns são a pele seca, a perda de cabelo, náuseas e vómitos, alterações no apetite e no paladar, problemas de coagulação do sangue, fadiga, sistema imunitário enfraquecido e, possivelmente, esterilidade. A maioria dos efeitos secundários desaparecem quando o tratamento acaba mas, por vezes podem ser permanentes como os danos nos rins, coração, pulmões ou sistema reprodutor (Luqmani, 2005; Partridge *et al.*, 2001).

Para além da falta de especificidade celular, a eficácia da quimioterapia é dependente de outros factores, tais como o metabolismo rápido da droga e a resistência à terapêutica que pode ser intrínseca à célula ou ser adquirida (Hanahan e Weinberg, 2011). Essa resistência pode ser provocada por diversos mecanismos bioquímicos, nomeadamente pela diminuição do influxo do composto nas células resultante do decréscimo da expressão das proteínas transportadoras ou de mutações que as inativem; pode ainda resultar do aumento do efluxo do composto resultante da sobre-expressão da glicoproteína-P, uma proteína expressa na membrana plasmática e que funciona como uma bomba de efluxo que bombeia os compostos para fora da célula (Luqmani, 2005; Gottesman, 2002; Tomida e Tsuruo, 2002; Sauna *et al.*, 2001). A inactivação dos agentes quimioterapêuticos pela sua degradação ou conjugação com enzimas impede a interacção destes com os seus alvos (Longley e Johnston, 2005; Luqmani, 2005). As células cancerígenas podem ser intrinsecamente resistentes a um agente em casos particulares que dizem respeito ao alvo de acção do composto, por exemplo, células com baixos níveis de topoisomerase I são resistentes a agentes que inibam a função dessa proteína (Longley e Johnston, 2005). O aumento da eficácia dos mecanismos de reparação de danos no DNA, provocada pelo aumento da expressão de uma ou várias proteínas envolvidas nesse processo, e o decréscimo da susceptibilidade à resposta apoptótica, originada pela inactivação da proteína p53, sobre-expressão de proteínas anti-apoptóticas ou sub-expressão de proteínas pró-apoptóticas, encontra-se igualmente associada à resistência à terapêutica aplicada (Longley e Johnston, 2005; Luqmani, 2005).

1.7. COMPOSTOS ANTI-TUMORAIS

Durante muito tempo, a aplicação de compostos constituídos por metais, como agentes terapêuticos, não suscitou interesse devido ao conhecimento da sua toxicidade e dos casos de envenenamento com metais pesados (Li *et al.*, 2009; Matos, 2001).

A descoberta da actividade anti-tumoral da cisplatina (*cis*-diaminodicloro-platina(II)) em 1965 pelo biofísico Barnett Rosenberg foi o primeiro passo para o estudo e desenvolvimento de novos complexos metálicos com actividade semelhante, quer constituídos por platina quer por outros metais, por exemplo ruténio, vanádio, ferro, cobalto, cobre, ouro e estanho, que também se revelaram vantajosos no tratamento do cancro (Alama *et al.*, 2009; Matos, 2001; Köpf-Maier e Köpf, 1987; Rosenberg *et al.*, 1965). A cisplatina é um dos agentes

quimioterapêuticos mais eficazes usados clinicamente, sendo aplicada em diversos cancros, mas maioritariamente no cancro dos testículos onde apresenta uma taxa de sucesso perto de 100 % quando detectado numa fase inicial (Bruijninx e Sadler, 2008). A cisplatina entra na célula na sua forma neutra, através de transporte activo e difusão, e torna-se biologicamente activa através de uma reacção de hidrólise na qual os dois átomos de cloro (grupos de saída) são substituídos por moléculas de água (Rafique *et al.*, 2010; Alama *et al.*, 2009; Boulikas e Vougiouka, 2003). A actividade anti-tumoral da cisplatina advém desta activação para posterior formação de aductos com a molécula de DNA, que resultam na inibição da replicação e transcrição do DNA e na paragem da proliferação de células cancerígenas, bem como na indução do processo apoptótico, e assim inibição do crescimento tumoral (Rafique *et al.*, 2010; Boulikas e Vougiouka, 2003). Os principais aductos formados pela cisplatina constam de aductos bifuncionais entre duas bases adjacentes na mesma cadeia do DNA (90 % das interacções observadas), sendo o principal o aducto 1,2 GG intracadeia (Hannon, 2007; Natile e Coluccia, 2001). Apesar das suas vantagens, a cisplatina não é específica para células cancerígenas, apresenta actividade sobre células com elevada capacidade de divisão, e desta forma pode afectar as células dos folículos do cabelo, da medula óssea e as células do tracto gastrointestinal, causando desta forma diversos efeitos secundários (Rafique *et al.*, 2010). O uso da cisplatina é assim limitado não só devido à sua toxicidade em tecidos saudáveis, mas também ao desenvolvimento de resistência por parte das células cancerígenas (Rafique *et al.*, 2010; Bruijninx e Sadler, 2008). Muitos análogos da cisplatina foram desenvolvidos mas apenas a carboplatina, a oxaliplatina e a nedaplatina são actualmente aplicados na clínica (Brabec e Nováková, 2006). Estes análogos apresentam efeitos tóxicos menos severos do que a cisplatina, por exemplo a nível renal e do sistema nervoso, mas podem desenvolver outros efeitos secundários e apresentar toxicidade a nível hematológico (Boulikas e Vougiouka, 2003). Estes agentes em conjunto com a cisplatina estão presentes em cerca de 50 % dos tratamentos quimioterapêuticos e quando combinados com outros agentes, são utilizados nos cancros dos ovários, da bexiga, colorectal, cervical, pulmão, cabeça e pescoço (Alama *et al.*, 2009; Brabec e Nováková, 2006; Boulikas e Vougiouka, 2003).

Para além da cisplatina também a adriamicina (ou doxorrubicina (DOX)), pertencente à classe das antraciclinas, se apresenta eficiente no tratamento de tumores sólidos como é o caso dos cancros da mama, esófago, fígado e linfoma de não-Hodgkin (Hannon, 2007; Gewirtz, 1999). A DOX tem capacidade de inibir a actividade da TOPO II pela ligação e estabilização do complexo DNA-TOPO II, não permitindo a religação das cadeias de DNA clivadas por este complexo, o que altera a estrutura do DNA, levando à inibição da síntese da molécula de DNA, assim como a capacidade da DOX em intercalar no DNA (Granados-Principal *et al.*, 2010; Minotti *et al.*, 2004; Gewirtz, 1999; Drummond *et al.*, 1996). Para além deste mecanismo pode ainda formar radicais livres que causam danos no DNA ou peroxidação lipídica (Granados-Principal *et al.*, 2010; Gewirtz, 1999). Dá-se assim a activação do mecanismo de apoptose como resposta final da célula aos danos provocados pela acção deste composto (Gewirtz, 1999). A utilização da DOX é limitada pelos efeitos tóxicos que desencadeia como sendo náuseas, vómitos e arritmia, bem como problemas crónicos, como danos no coração, fígado, cérebro e rins, e ainda pelo desenvolvimento de resistência das células tumorais a este composto (Granados-Principal *et al.*, 2010; Drummond *et al.*, 1996).

Os complexos metálicos são constituídos por um átomo ou ião metálico central ao qual se ligam moléculas ou iões, os ligandos, que apresentam por si só propriedades químicas e biológicas relevantes (Rafique *et al.*, 2010; Alama *et al.*, 2009; Cavaleiro, 2004). Estes complexos apresentam diversos números de coordenação e geometrias que lhes permite organizar os seus ligandos em distribuições espaciais com melhores modalidades de ataque para as moléculas alvo (Alama *et al.*, 2009). Estes complexos interferem na viabilidade celular, alguns de forma directa, enquanto outros precisam da conversão do composto inerte num composto activo (Alama *et al.*, 2009).

A interacção dos complexos metálicos com o DNA é um dos principais factores para a sua utilização como agentes terapêuticos, uma vez que reconhecem sequências específicas do DNA, alteram a sua estrutura e inibem o acesso de proteínas activadoras ou repressoras, afectando a expressão de genes e levando, por fim, à morte celular (Bruijninx e Sadler, 2008; Tabassum e Pettinari, 2006). Como os ligandos influenciam a reactividade dos complexos, a manipulação destes tem como objectivo facilitar a interacção entre o complexo metálico e o DNA (Macías *et al.*, 2007).

Para além dos compostos de platina existem outros com propriedades anti-tumorais, como os compostos inorgânicos e organometálicos, dos quais fazem parte elementos como gálio, germânio e estanho ou metais de transição, tais como o titânio, vanádio, ferro, cobre, cobalto, ruténio ou ouro (Alama *et al.*, 2009; Köpf-Maier e Köpf, 1987).

1.7.1. COMPLEXOS DE COBRE

Os complexos de cobre apresentam-se entre os complexos de metais de transição mais estudados quanto às suas propriedades anti-tumorais (Macías *et al.*, 2007). O cobre é encontrado em animais e plantas e é um elemento essencial para a função de enzimas e proteínas envolvidas no metabolismo energético, respiração e síntese de DNA (Marzano *et al.*, 2009). Este metal funciona como cofactor catalítico em várias enzimas estando envolvido ainda em reacções de oxidação-redução nas quais reage com o oxigénio molecular para produção de radicais livres (Marzano *et al.*, 2009).

As propriedades dos complexos de cobre são determinadas pela natureza dos ligandos orgânicos, sendo que eles próprios podem apresentar actividade anti-proliferativa, e ainda pelos átomos dadores ligados ao metal (Marzano *et al.*, 2009; Köpf-Maier, 1994). Os ligandos neutralizam a carga eléctrica do ião de cobre, facilitam o transporte do complexo através da membrana celular, intercalam no DNA ou então interagem não-covalentemente com proteínas (Iakovidis *et al.*, 2011).

Os complexos de cobre apresentam capacidade de induzir quebras no DNA através de clivagens hidrolíticas ou oxidativas (Macías *et al.*, 2007; Rajendiran *et al.*, 2007). A clivagem hidrolítica do DNA envolve a quebra da ligação fosfoéster originando fragmentos que podem ser religados, enquanto a clivagem oxidativa é mediada por espécies reactivas de oxigénio (ROS, do inglês, *reactive oxygen species*) e produz fragmentos de DNA que não podem ser religados, causando efeitos citotóxicos graves (Li *et al.*, 2009).

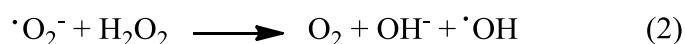
Muitos complexos de cobre são conhecidos por induzirem a apoptose através da produção de ROS. Este mecanismo de morte celular é desencadeado após indução de ROS pelas células cancerígenas, isto é, cancros resistentes a agentes anti-tumorais apresentam frequentemente baixos níveis de ROS que favorecem a produção da glicoproteína-P, conhecida por fazer parte do mecanismo de resistência. Assim, o *stress* oxidativo está ligado à sensibilidade ou resistência das células cancerígenas aos compostos anti-tumorais (Mookerjee *et al.*, 2006).

Nos complexos de cobre, este metal varia entre os estados de oxidação Cu(II) e Cu(I) de forma a catalisar a formação de espécies reactivas de oxigénio (Macías *et al.*, 2007). Radicais hidroxilo são produzidos através da reacção de Fenton e do mecanismo de Haber-Weiss (Liu *et al.*, 1999). Na reacção de Fenton, o ião metálico catalisa a formação do radical a partir de peróxido de hidrogénio (H₂O₂) (Iakovidis *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 1999):



L = ligando

No mecanismo de Haber-Weiss ocorre a reacção do superóxido com o H₂O₂ (catalisada pelo metal) para produzir dioxigénio, hidróxido e o radical hidroxilo (reacção 2), sendo constituída por dois passos (Valko *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 1999):



O radical hidroxilo é muito reactivo e tem um tempo de meia-vida em solução aquosa de 1 nanosegundo (Valko *et al.*, 2004). Quando o radical é produzido *in vivo* poderá então reagir com a molécula de DNA, reagindo com as suas bases ou com a desoxirribose causando modificações nas purinas e pirimidinas ou quebras na cadeia do DNA (Valko *et al.*, 2004; Theophanides e Anastassopoulou, 2002; Halliwell e Gutteridge, 1990).

O composto de cobre em estudo neste trabalho, [Cu(H₂O)(DMSO)(ph-tpy)](NO₃)₂, aqui denominado de ZM V, representado na Figura 1.8, apresenta três ligandos, a água, o DMSO (do inglês, *dimethyl sulfoxide*) e o ph-tpy (do inglês, *4'-phenyl-2,2':6',2''-terpyridine*), sendo os dois primeiros ligandos monodentados e o último um ligando tridentado.

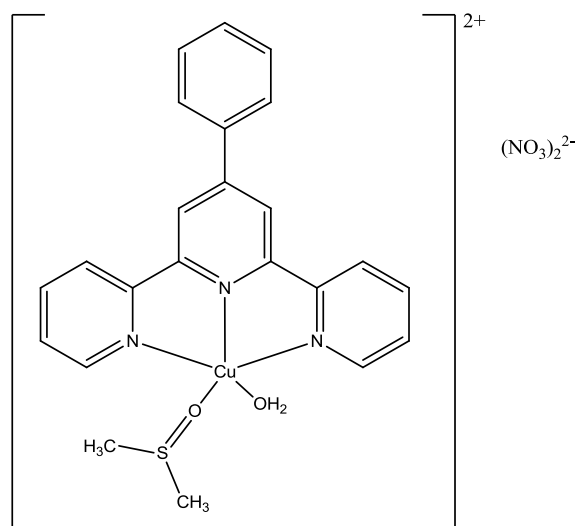


Figura 1.8 – Estrutura química do composto $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})(\text{DMSO})(\text{ph-tpy})](\text{NO}_3)_2$, denominado ZM V, que apresenta três ligandos: a água, o DMSO e o ph-tpy (ou 4'-fenil-2,2':6',2''-terpiridina).

1.8. MODELOS BIOLÓGICOS: LINHAS CELULARES TUMORAIS

1.8.1. CARCINOMA COLORECTAL HUMANO

O carcinoma colorrectal (CCR) é o terceiro principal cancro diagnosticado em homens e o segundo em mulheres, perfazendo no total mais de 1,2 milhões de novos casos e 608 700 mortes, em 2008 (Jemal *et al.*, 2011). Os principais factores de risco incluem o tabagismo, consumo excessivo de álcool, obesidade, ausência de exercício físico e consumo de carne vermelha e carne processada (Potter, 1999).

No processo de tumorigénese do CCR (representado na Figura 1.9) o primeiro evento consiste na formação de pólipos, que se caracterizam pelo crescimento de células desde a parede do intestino até ao lúmen. Os pólipos podem ser divididos em duas classes: os não-displásicos e os displásicos (ou pólipos adenomatosos). Os pólipos não displásicos apresentam uma estrutura epitelial semelhante ao das criptas saudáveis, são tumores benignos e com baixa tendência para progredirem. Os pólipos displásicos com o aumento do seu tamanho podem tornar-se malignos (Bunz, 2008). Quando os tumores se encontram numa fase avançada (carcinoma), as células malignas são capazes de digerir o colagénio, invadir os tecidos adjacentes, entrar na corrente sanguínea, atingir os nódulos linfáticos e alojarem-se noutros órgãos, em especial no fígado (Bunz, 2008; Gutman e Fidler, 1995; Boland, 1993).

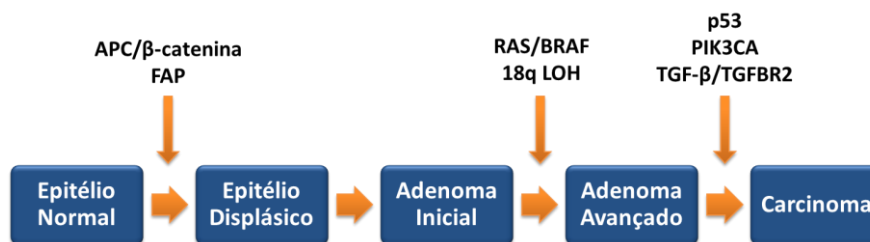


Figura 1.9 – Progressão de células do epitélio saudável a carcinoma colorrectal. O processo de tumorigénese do CCR é iniciado com a transformação do epitélio colorrectal normal num adenoma, e seguidamente, desenvolve-se em um carcinoma após aquisição de características invasivas. Todo o processo é controlado por várias mutações, sendo a mutação promotora a que ocorre na via APC, seguindo-se o acumular de outras mutações no oncogene RAS e no gene supressor de tumores *TP53* (Adaptado de Chu, 2008).

Através da acumulação de alterações genéticas (activação de oncogenes ou inactivação de genes supressores de tumores) e epigenéticas as células epiteliais saudáveis transformam-se e progridem para células cancerígenas (Chu, 2008). Destas a mais conhecida e aparentemente a mais precoce consta da disrupção da via APC que se encontra presente em cerca de 95 % dos cancros do colon (Zhang *et al.*, 2001a). Mutações no gene *APC* (do inglês, *adenomatous polyposis coli*) estão associadas a formas hereditárias de CCR, como o caso da polipose adenomatosa familiar (FAP, do inglês, *familial adenomatous polyposis*) que se caracteriza pelo desenvolvimento de adenomas colorrectais durante a infância, podendo progredir para cancro em idades mais precoces do que em indivíduos que não sofram desta doença (Chu, 2008; Potter, 1999; Fearon e Jones, 1992). Outra forma hereditária do CCR é o HNPCC (do inglês, *hereditary nonpolyposis colorectal cancer*) causado por mutações em genes responsáveis pela reparação de erros *mismatch* do DNA (Chu, 2008; Potter, 1999). As formas hereditárias do carcinoma são cerca de 8 a 15 % de todos os casos de CCR e o CCR não hereditário conta com 85 a 90 % dos casos (Chu, 2008).

Os pólipos benignos formados durante a génese tumoral podem ser removidos durante a colonoscopia, mas os malignos necessitam de uma cirurgia mais extensa. A cirurgia pode ser combinada com a quimioterapia ou radioterapia no caso de ter já ocorrido metástases (Bunz, 2008; Chu, 2008), mas cerca de um terço dos pacientes morre devido à recorrência do tumor ou a metástases resistentes à terapia convencional (Gutman e Fidler, 1995).

Durante anos o tratamento do CCR baseava-se na administração do 5-fluorouracil (5-FU). Este agente podia ser administrado por injeção de curta-duração, tendo como mecanismo de acção a inibição da síntese do RNA, ou como infusão de longa-duração, impedindo a síntese de DNA através da inibição da timidilato sintase, mas em ambos os casos apresentava baixas taxas de resposta (Chu, 2008; Goldberg *et al.*, 2004). Seguidamente, a combinação do 5-FU com a leucovorina (LV) aumentou a afinidade do 5-FU à timidilato sintase (Saltz *et al.*, 2000). O irinotecano, um inibidor da topoisomerase I e, portanto, da divisão celular, quando combinado com o 5-FU e a LV permite o aumento da taxa de resposta à terapia para 31 % (Goldberg *et al.*, 2004; Douillard *et al.*, 2000; Saltz *et al.*, 2000). A oxaliplatina, um análogo da cisplatina que forma aductos no DNA bloqueando a replicação e transcrição do mesmo, também foi combinada com o 5-FU e a LV aumentando a resposta ao tratamento para 45 % (André *et al.*,

2004; Goldberg *et al.*, 2004). Assim, actualmente o tratamento para o CCR consiste no uso do 5-FU com LV combinado com irinotecano ou oxaloplatina, contudo apresentando alguns efeitos secundários, tais como, diarreia, vómitos, náuseas e desidratação (Van Cutsem *et al.*, 2009; Goldberg *et al.*, 2004).

1.8.2. CARCINOMA HEPATOCELULAR HUMANO

O cancro do fígado é o quinto mais diagnosticado nos homens e o sétimo nas mulheres a nível mundial, representando a segunda causa de morte por cancro nos homens. Em 2008 estimou-se mundialmente a existência de 748 300 novos casos e 695 900 mortes. O carcinoma hepatocelular (CHC) representa 70 a 85 % do número total de casos de cancro do fígado (Jemal *et al.*, 2011).

A maioria dos casos de CHC desenvolve-se em fígados com cirrose, que em conjunto com a disseminação das infecções pelo vírus da hepatite B e C, constituem os principais factores de risco para o desenvolvimento deste cancro (Figura 1.10), sendo registados em 80 % dos casos de CHC (Pang *et al.*, 2008; Llovet *et al.*, 2003; Thorgeirsson e Grisham, 2002). A presença de agentes carcinogénicos também contribui para o desenvolvimento do CHC, como por exemplo a aflatoxina B₁ (Figura 1.10), uma micotoxina proveniente dos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* (Pang *et al.*, 2008; Llovet *et al.*, 2003; Smela *et al.*, 2001). O consumo excessivo de álcool, o tabaco e os diabetes são outros factores de risco a contribuírem para o desenvolvimento de CHC (Yu e Yuan, 2004).

Infecções crónicas derivadas dos vírus da hepatite B e C resultam muitas vezes na formação de estados de cirrose e na promoção de alterações fenotípicas em hepatócitos que, por vezes, desencadeiam a formação de hepatócitos displásicos, ou seja, com maior tendência para alterações genéticas, como por exemplo aumento da actividade da telomerase e deleções alélicas, o que leva por fim ao desenvolvimento do CHC (Figura 1.10) devido à ocorrência de mutações adicionais (Abou-Alfa, 2006; Anzola, 2004; Thorgeirsson e Grisham, 2002).

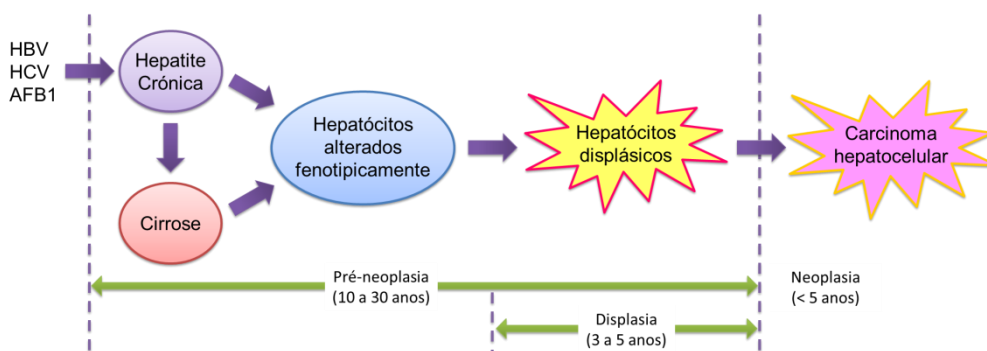


Figura 1.10 – Principais fases do desenvolvimento do carcinoma hepatocelular humano. Os vírus da hepatite B e C (HBV e HCV, respectivamente), a aflotoxina B₁ (AFB1) e a cirrose são os principais factores a contribuir para o desenvolvimento do CHC, procedendo à formação de hepatócitos com alterações fenotípicas e hepatócitos displásicos que progridem para formação do estado maligno de carcinoma (Adaptado de Thorgeirsson e Grisham, 2002).

O tipo de tratamento a ser aplicado ao CHC depende da fase em que se encontra o tumor, da quantidade de carcinomas e nódulos existentes, do seu tamanho, do estado do fígado e da existência ou não de propriedades invasivas (Llovet *et al.*, 2003). Os principais tratamentos aplicados constam da ressecção cirúrgica, do transplante de fígado e de tratamentos percutâneos (Anzola, 2004). A ressecção apresenta-se o tratamento mais eficaz, sendo aplicada terapêutica de escolha em pacientes de CHC assintomáticos e não-cirróticos (Bruix e Llovet, 2002). A possibilidade de recorrência, muitas vezes devido a metástases microscópicas, é a maior desvantagem deste tratamento e a principal causa de morte por CHC (Pang *et al.*, 2008). O transplante de fígado permite não só curar o CHC como ainda eliminar o problema de cirrose, mas também neste caso, a recorrência do tumor é comum (Llovet *et al.*, 2003). Os tratamentos percutâneos são administrados numa fase inicial do CHC, isto é, quando se observam apenas tumores pequenos, mas aos mesmos podem estar associados problemas de disseminação do tumor (Bruix e Llovet, 2002).

O facto da maioria dos pacientes com CHC apresentar cirrose, torna a quimioterapia um tratamento inviável, devido ao desenvolvimento de problemas de resistência (Pang *et al.*, 2008; Abou-Alfa, 2006). Agentes quimioterapêuticos como a DOX apresentaram uma resposta de apenas 11 % e a sua combinação com cisplatina, interferão e 5-fluorouracil mostra uma taxa de resposta ligeiramente superior, sendo de apenas 26 % (Abou-Alfa, 2006). Uma terapia dirigida a determinados alvos moleculares, com a capacidade de inibição da angiogénese, bloqueio dos sinais proliferativos ou estímulo da apoptose, poderiam revelar resultados promissores (Pang *et al.*, 2008).

1.8.3. CANCRO DA MAMA HUMANO

O cancro da mama é o tipo de cancro mais frequentemente diagnosticado em mulheres, contabilizando no total em 2008 cerca de 1,38 milhões de novos casos e 458 400 de mortes (Jemal *et al.*, 2011). Os homens também podem desenvolver este tipo de cancro, contudo tal ocorre em número mais reduzido, estimando-se a existência de 1500 casos e 270 mortes, por ano, nos Estados Unidos (Simstein *et al.*, 2003).

Diversas causas contribuem para a incidência do cancro da mama, tais como o consumo de álcool, factores reprodutivos ou hormonais e a disponibilidade de serviços que permitam a sua detecção precoce (Jemal *et al.*, 2011). Entre os factores reprodutivos encontram-se o início precoce da menstruação, nuliparidade ou idade tardia do primeiro parto, curta duração do aleitamento, menopausa tardia, obesidade pós-menopausa, uso prolongado de contraceptivos orais e terapia de reposição de estrogénio prolongada (Russo *et al.*, 2000). A nível hormonal, a exposição a elevados níveis de estrogénio pode contribuir para o desenvolvimento do cancro da mama pelo facto de a maioria destes cancros conterem receptores (ER, do inglês, *estrogen receptor*) para esta hormona (Russo *et al.*, 2000).

O desenvolvimento do cancro da mama (Figura 1.11) passa por diversas etapas sendo os estadios iniciais a hiperplasia ductal e a hiperplasia ductal atípica, a qual consiste numa lesão hiperplásica nos ductos mamários, apresentando algumas características do carcinoma *in situ* (Burstein *et al.*, 2004; Polyak, 2001; Russo *et al.*, 1998; Beckmann *et al.*, 1997). Ocorre a

progressão gradual para o carcinoma ductal *in situ* que consiste na proliferação clonal de células com características malignas, que se acumulam no lúmen dos ductos mamários sem invasão para além da membrana basal epitelial, e seguidamente progride para o carcinoma invasivo adquirindo, por fim, a capacidade de metastização (Burstein *et al.*, 2004; Polyak, 2001; Russo *et al.*, 1998; Beckmann *et al.*, 1997).

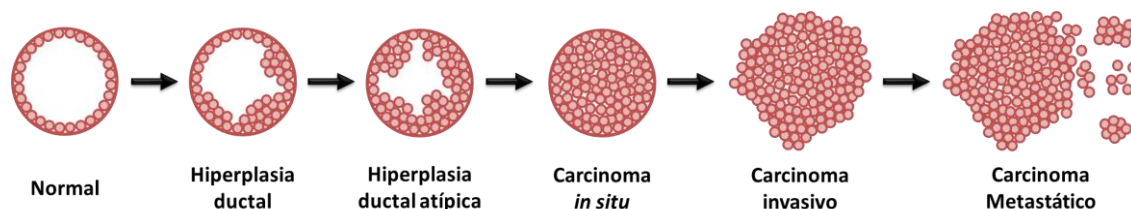


Figura 1.11 – Modelo do processo de carcinogénese do cancro da mama. Na fase inicial ocorre uma hiperplasia nos ductos mamários que se desenvolve numa hiperplasia atípica progredindo para um carcinoma *in situ*, o precursor do carcinoma invasivo podendo ocorrer ainda metastização. A progressão do cancro da mama deve-se a diversos processos, tais como alterações hormonais, mutações genéticas (activação de oncogenes e inactivação de genes supressores de tumores, como nos genes *BRCA1* e *BRCA2* e na proteína p53), alterações nos receptores de estrogénio e inactivação de moléculas responsáveis pela adesão entre células (E-caderina e integrinas, por exemplo) (Beckmann *et al.*, 1997) (Adaptado de Polyak, 2001).

Mutações em dois genes, *BRCA1* e *BRCA2* (do inglês, *breast cancer susceptibility gene*), estão associadas a uma maior susceptibilidade em desenvolver quer o cancro da mama assim como o cancro dos ovários (Antoniou *et al.*, 2008). O *BRCA1* e o *BRCA2* são genes supressores de tumores presentes no tecido mamário saudável, mas em ambos os cancros referidos encontram-se ausentes ou com uma expressão reduzida (Sanz *et al.*, 2010; Bunz, 2008; Chabalier *et al.*, 2006). A família de receptores membranares HER2 (do inglês, *human epidermal growth factor receptor-2*) envolvidos na via de transdução de sinais que regulam a proliferação e a diferenciação celular encontram-se frequentemente sobre-expressos no cancro da mama e dos ovários, devido à amplificação do gene *HER2* (Slamon *et al.*, 2001; Yarden, 2001). Recentemente foi observada a existência de cancros da mama com ausência ou baixos níveis de expressão de receptores de estrogénio (ER) e de progesterona (PR, do inglês, *progesterone receptor*) e ausência de sobre-expressão do receptor membranar HER2, mas apresentando desregulação de *BRCA1* (O’Shaughnessy *et al.*, 2011; Foulkes *et al.*, 2010).

Como tratamentos para o cancro da mama pode ser aplicada a cirurgia, radioterapia, quimioterapia e terapia hormonal (Weigelt *et al.*, 2005; Yarden, 2001). Na cirurgia remove-se todo o tumor com uma margem de tecido saudável e, caso não seja retirada a mama, é ainda aplicada radioterapia de forma a diminuir a possibilidade de recorrência (Agrawal, 2010). Quando o carcinoma está confinado à mama a taxa de cura excede os 90 % (Welch *et al.*, 2000). Nos cancros metastáticos, a quimioterapia e a terapia hormonal são as mais utilizadas, mas a taxa de sucesso nesta fase da doença é extremamente baixa (Yarden, 2001). Cerca de um terço das mulheres com cancro da mama desenvolvem metástases preferencialmente nos nódulos linfáticos, ossos, fígado e pulmões, e estas podem levar à sua morte (Simstein *et al.*, 2003). Desta forma, pacientes cujo tumor foi removido e estejam a ser tratadas com

radioterapia, são também sujeitas a quimioterapia de modo a evitar a ocorrência de metástases, uma vez que o seu aparecimento é difícil de prever (Weigelt *et al.*, 2005).

1.9. INTRODUÇÃO AO TEMA DA TESE

Com a realização deste trabalho pretendeu-se caracterizar a potencial acção anti-tumoral de um novo composto de cobre, designado ZM V, contendo como ligandos H₂O, DMSO e 4'-fenil-2,2':6',2''-terpiridina. Para tal, foi avaliado o seu potencial citotóxico em linhas celulares tumorais humanas e em linhas não-tumorais humanas, avaliando os seus potenciais mecanismos de acção pela observação da indução do processo apoptótico (potencial apoptótico) e da interferência do composto na progressão do ciclo celular (potencial citostático). A genotoxicidade do complexo foi também avaliada através da sua capacidade em interagir com a molécula de DNA. Estudos realizados a diversos complexos de cobre demonstraram a sua capacidade de induzir quebras no DNA, quer por processos hidrolíticos como oxidativos, e ainda a indução da apoptose através da formação de ROS que, para além de promoverem a clivagem do DNA, também interagem com proteínas e fosfolípidos (Marzano *et al.*, 2009; Macías *et al.*, 2007; Mookerjee *et al.*, 2006; Valko *et al.*, 2004). Tratando-se o ZM V de um complexo de cobre é possível que este apresente as mesmas características já demonstradas por complexos semelhantes e, como tal, tornou-se interessante proceder a um estudo detalhado do potencial anti-tumoral do composto ZM V e dos seus alvos biológicos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. COMPOSTO EM ESTUDO

O composto metálico de cobre utilizado na base deste trabalho, referido por ZM V, foi sintetizado no Centro de Química Estrutural do Instituto Superior Técnico. Preparou-se uma solução *stock* em DMSO (Sigma) com uma concentração de 25,9 mM, sendo depois armazenado à temperatura ambiente. Na Tabela 2.1 encontram-se as informações relativas ao composto ZM V, nomeadamente a sua fórmula química, o seu peso molecular e o solvente utilizado neste trabalho.

Tabela 2.1 – Propriedades do composto metálico de cobre, ZM V.

Composto	Fórmula Química	Peso Molecular (g/mol)	Solvente
ZM V	$C_{23}H_{23}CuN_5O_8S$	593,1	DMSO

2.2. LINHAS CELULARES HUMANAS

Neste trabalho foram utilizadas três linhas celulares tumorais humanas, HCT116, HepG2 e MCF-7, correspondentes ao carcinoma colorectal, carcinoma hepatocelular e adenocarcinoma da mama, respectivamente, gentilmente cedidas pela Professora Doutora Cecília Rodrigues do Research Institute for Medicine and Pharmaceutical Sciences (iMed), Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa. A linha tumoral HCT116 é constituída por células epiteliais aderentes provenientes do colon de um homem adulto com carcinoma colorectal (http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CCL-247.aspx?geo_country=pt). A linha tumoral HepG2 foi isolada do fígado de um adolescente de 15 anos do sexo masculino com carcinoma hepatocelular diferenciado e é composta igualmente por células epiteliais aderentes (http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HB-8065.aspx?geo_country=pt). A linha tumoral MCF-7 provém da glândula mamária de uma mulher adulta de 69 anos com adenocarcinoma, formada também por células epiteliais aderentes (http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-22.aspx?geo_country=pt).

Como controlo dos ensaios de avaliação de citotoxicidade, utilizou-se a linha celular não-tumoral humana MCF-10A, cedida pelo Professor Doutor António Sebastião Rodrigues do Departamento de Genética do Centro de Investigação em Genética Molecular e Humana (CIGMH), Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, e a linha celular de fibroblastos, cedida pela Professora Doutora Isabel Carreira do Laboratório de Genética Molecular de Cardiopatias e Neurociências, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. A linha MCF-10A é proveniente da glândula mamária de uma mulher de 36 anos com doença fibrocística, também constituída por células epiteliais aderentes (http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-10317.aspx?geo_country=pt). A linha celular de fibroblastos aderentes provém de uma cultura primária derivada de tecido neonatal.

2.2.1. CULTURA DAS LINHAS TUMORAIS E NÃO-TUMORAIS

As linhas tumorais HCT116, HepG2 e MCF-7 foram cultivadas em frascos de cultura BD Falcon de 75 cm² (BD Biosciences, New Jersey, EUA) em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM; Invitrogen, New York, EUA) suplementado com 10 % (v/v) de Soro Fetal Bovino (FBS; Invitrogen) e 1 % (v/v) de antibiótico/antimicótico Penicilina-Estreptomicina (*Pen-Step+Antimycotic*; Invitrogen), sendo este denominado de meio de cultura completo. Para a linha tumoral HepG2 adicionou-se também 1 % (v/v) de aminoácidos *MEM Non Essential Amino Acids* 100x (Invitrogen) ao meio de cultura completo.

A linha não-tumoral MCF-10A foi cultivada igualmente em frascos de cultura de 75 cm² em meio de cultura DMEM/F12 (Invitrogen) suplementado com 0,5 mg/mL de hidrocortisona (1 mg/mL; Sigma, Missouri, EUA), 5 % (v/v) de soro de cavalo (Sigma) e 20 ng/mL de EGF (100 µg/mL; Sigma), adicionando-se no momento da cultura 100 ng/mL de toxina colérica (1 mg/mL; Sigma) e 10 µg/mL de insulina (10 mg/mL; Sigma).

Os frascos de cultura foram incubados na estufa de CO₂ (Leec, Nottingham, Reino Unido) a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa.

2.2.2. MANUTENÇÃO DAS CULTURAS CELULARES

As culturas celulares foram renovadas semanalmente ao atingirem cerca de 80 % de confluência, a qual foi determinada por visualização ao microscópio óptico invertido Olympus CXX41 (Olympus, Tóquio, Japão). Em primeiro lugar, aspirou-se todo o meio de cultura, adicionou-se 5 mL de tripsina (Invitrogen) e incubou-se durante 5 minutos (min) a 37 °C, na presença de 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa, com o objectivo de induzir a perda de aderência de todas as células à base do frasco, facto controlado por observação ao microscópio. De seguida, adicionou-se 5 mL de meio de cultura completo, de modo a neutralizar a acção da tripsina, transferiu-se o volume para tubos BD Falcon de 50 mL (BD Biosciences) e centrifugou-se a 1500 rotações por minuto (rpm) durante 5 min numa centrífuga (Hettich EBA21, Tuttlingen, Alemanha), eliminando-se posteriormente os sobrenadantes. Ressuspenderam-se os sedimentos resultantes em 2 mL de meio completo e num novo frasco de cultura de 75 cm² adicionaram-se 15 mL de meio completo para cada uma das culturas referidas anteriormente ao qual se adicionaram 50 µL da suspensão celular e incubou-se a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa.

2.3. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO

2.3.1. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

O composto ZM V foi avaliado quanto ao seu potencial citotóxico nas linhas tumorais HCT116, HepG2 e MCF-7, assim como nas linhas não-tumorais MCF-10A e fibroblastos, de modo a investigar a toxicidade do composto.

Neste ensaio foi utilizada uma densidade celular de $0,75 \times 10^5$ células/mL, calculada pela contagem de células viáveis num hemocitômetro (Hirschmann, Eberstadt, Alemanha) através do método de exclusão pelo azul de *Trypan*. Este corante permite distinguir células viáveis, sem coloração, de células não viáveis, com coloração azul, devido à entrada do corante em células com a membrana celular comprometida. Preparou-se uma solução contendo 350 µL de meio completo, 50 µL de suspensão celular (obtida no ponto 2.2.2) e 100 µL de azul de *Trypan* a 0,4 % (v/v) (Sigma). Após a contagem das células ao microscópio óptico, calculou-se a densidade celular através da equação (1):

$$(1) \frac{N^{\circ} \text{ Células}}{\text{mL}} = \frac{\sum N^{\circ} \text{ Células dos 4 Quadrantes}}{4} \times 10^4 \text{ (Volume câmara em mm}^3\text{)} \times \text{Factor de Diluição}$$

Determinou-se em seguida o volume de suspensão celular necessário para preparar uma solução com densidade celular de $0,75 \times 10^5$ células/mL. Pipetaram-se, para cada poço de uma placa de 96 poços de fundo plano (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Bélgica), 100 µL da solução anterior, incubando-se nas condições de 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa, durante 24 horas (h).

A partir da solução *stock* de composto, prepararam-se várias diluições em meio de cultura completo com concentrações de 0,01 a 500 µM para as linhas tumorais HCT116, HepG2 e MCF-7, 0,025-250 µM para a linha celular MCF-10A e 0,01-10 µM para a linha celular de fibroblastos. A adição do composto foi realizada após observação no microscópio invertido da morfologia e de uma confluência celular de aproximadamente 80 %. De seguida, aspirou-se o meio de cultura dos poços e, em cada um, colocaram-se 100 µL de cada uma das diluições preparadas e 100 µL de uma solução controlo de meio de cultura contendo apenas 0,1 % (v/v) de DMSO (Sigma). Incubou-se a placa durante 48h a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa. Após esse período, utilizou-se o *Kit CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay* (Promega, Madison, EUA), conforme indicado pelo fabricante, de forma a avaliar a viabilidade celular. Preparou-se uma solução colorimétrica de MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio)/PMS (metossulfato de fenazina) na proporção de 100 µL de meio completo: 20 µL de MTS: 1 µL de PMS. Aspirou-se o meio de cada poço da placa de 96 poços e este foi substituído por 100 µL da solução colorimétrica, incubando-se, de seguida, durante 30 min a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa. A medição da absorvância a 490 nm foi realizada num leitor de microplacas *Multiskan FC Microplate Photometer* (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA), determinando-se a viabilidade celular com recurso à equação (2):

$$(2) \quad \text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{Abs}_{490}(\text{amostra})}{\text{Abs}_{490}(\text{controlo})} \times 100$$

O valor de IC₅₀ (do inglês *Inhibitory Concentration*) relativo, ou seja, a concentração de composto necessária para redução de 50 % de viabilidade celular, foi calculado através do programa *GraphPad* (GraphPad Software Inc., CA, EUA). O ensaio foi realizado em triplicado para as diferentes concentrações do composto em estudo.

2.4. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL APOPTÓTICO

2.4.1. MARCAÇÃO COM A SONDA HOECHST 33258

A sonda Hoechst 33258 apresenta afinidade para ácidos nucleicos (comprimentos de onda de excitação e emissão de 352 e 461 nm, respectivamente, quando ligada ao DNA), o que por sua vez permite verificar alterações na morfologia nuclear, através de análises por microscopia de fluorescência (Hoechst Stains, MP21486, Invitrogen 2005). Os ensaios de microscopia de fluorescência através da marcação com a sonda Hoechst 33258 constituem uma avaliação preliminar da capacidade do composto em induzir a apoptose (Cao *et al.*, 2011).

Neste ensaio utilizaram-se as linhas tumorais HCT116 e HepG2 preparando-se, para cada uma, placas de cultura de 35 mm (Orange Scientific) com uma densidade celular final de 1×10^5 células/mL que foram incubadas durante 24 h a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa. Findo esse período, as células foram tratadas, após eliminado o meio de cultura antigo, com 2 mL de cada uma das soluções de composto em estudo nas concentrações de 0,025; 0,05 e 0,1 µM (soluções preparadas por diluição da solução *stock* em meio de cultura) bem como 2 mL de uma solução controlo contendo apenas 0,1 % (v/v) de DMSO. Incubaram-se as placas durante 24 h a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa.

De seguida, aspirou-se o meio de cultura das placas e lavaram-se as células três vezes com 1 mL de Tampão de Fosfato Salino 1x (PBS 1x; Invitrogen). Para fixação das células, adicionou-se 1 mL de solução fria de Paraformaldeído 4 % (v/v) em PBS 1x e procedeu-se a uma incubação de 10 min na ausência de luz à temperatura ambiente. As células foram novamente lavadas três vezes com 1 mL de PBS 1x. Preparou-se uma solução de Hoechst 33258 (Sigma) constituída por 2 µL de Hoechst 33258 (5 mg/mL) em 1 mL de PBS 1x e colocou-se 1 mL dessa solução em cada placa, incubando-se durante 15 min na ausência da luz à temperatura ambiente. As células foram então lavadas três vezes com 1 mL de PBS 1x e adicionou-se, no centro da placa, 20 µL da solução de glicerol em PBS 1x na proporção de 1:3 (v/v), colocando-se uma lamela por cima. As placas foram observadas ao microscópio de fluorescência Olympus BX51 e fotografadas com a máquina fotográfica Olympus DP50 (Olympus) acoplada ao microscópio, sendo as fotografias adquiridas pelo *software AnalySIS Soft Imaging System* (Olympus). Este ensaio foi realizado em triplicado.

2.4.2. MARCAÇÃO COM ANEXINA V-FITC E IODETO DE PROPÍDIO

A Anexina V consiste numa proteína com elevada afinidade de ligação à fosfatidilserina, um fosfolípido presente no folheto interno da membrana celular, que é externalizado numa fase inicial da apoptose antes de ocorrer a perda da integridade (Cao *et al.*, 2011; Brumatti *et al.*, 2008). O Iodeto de Propídio (IP) consegue apenas penetrar nas células quando se verifica a perda da integridade da membrana celular, a qual ocorre durante a apoptose tardia ou necrose, e desta forma consegue ligar-se aos ácidos nucleicos (Brumatti *et al.*, 2008; Riccardi e Nicoletti, 2006). Assim, a dupla marcação com Anexina V-FITC e IP representa uma técnica fácil e de grande sensibilidade para a detecção de células em apoptose através de citometria de

fluxo, permitindo diferenciar células em apoptose inicial de células em apoptose tardia e, também, distinguir células em apoptose de células em necrose (Brumatti *et al.*, 2008).

O ensaio de marcação com Anexina V-FITC e IP foi realizado no Laboratório de Imunologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa no âmbito de um protocolo estabelecido com a Professora Paula Videira.

Neste ensaio utilizou-se a linha tumoral HCT116 cujas células foram cultivadas em frascos de cultura BD Falcon de 25 cm² (BD Biosciences) numa densidade celular de 0,75x10⁵ células/mL e incubadas a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa, durante 24 h. Adicionou-se, a cada frasco, 3 mL de cada solução de composto preparadas por diluição da solução *stock* em meio de cultura com as concentrações finais de 0,05 e 0,1 µM ou 3 mL de uma solução a 0,1 % (v/v) de DMSO (controlo). Incubaram-se as células durante 48 h a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa. Posteriormente para recolher as células, aproveitou-se o sobrenadante para tubos BD Falcon de 15 mL (BD Biosciences) e tripsinizaram-se as células adicionando 1,5 mL de tripsina a cada frasco incubando por 5 min nas condições anteriores. O volume total foi centrifugado a 1500 rpm durante 5 min a 25 °C, eliminando-se posteriormente o sobrenadante. O sedimento resultante foi ressuspensão em 2 mL de PBS 1x para lavagem das células. Centrifugou-se novamente a 1500 rpm por 5 min a 25 °C e eliminou-se o sobrenadante.

Para marcação das células com Anexina V-FITC e IP recorreu-se ao *Kit Annexin-V FITC Apoptosis* (Invitrogen). Assim, os sedimentos obtidos anteriormente foram ressuspensos em 100 µL de tampão de ligação da Anexina V 1x, adicionando-se ainda 5 µL de Anexina V conjugada com FITC e 2 µL de IP, e incubados 15 min na ausência de luz e à temperatura ambiente. Adicionou-se 400 µL de tampão de ligação da Anexina V 1x e transferiu-se o volume total para tubos de 1,5 mL, aos quais foi adicionado ainda 500 µL de PBS 1x. A análise das amostras foi realizada por citometria de fluxo no citómetro de fluxo *Attune® Acoustic Focusing Flow Cytometer* (Life Technologies, Carlsbad, Califórnia) pela aquisição de 10000 eventos por amostra e a análise dos resultados foi realizada através do *Attune® Cytometric software* (Life Technologies). O ensaio foi realizado em triplicado.

2.5. EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA APOPTOSE

A expressão dos genes envolvidos no processo apoptótico *BAX*, *BCL-2* e *CASP3* que codificam para as proteínas Bax, Bcl-2 e caspase 3, respectivamente, foi analisada por PCR em tempo real (RT-PCR) em células da linha tumoral HCT116.

As células desta linha foram cultivadas em frascos de 25 cm² numa densidade celular de 2x10⁵ células/mL e incubadas a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa durante 24 h. Adicionou-se 3 mL do composto ZM V numa concentração de 0,05 µM (solução preparada por diluição da solução *stock* em meio de cultura) ou uma solução de DMSO a 0,1 % (v/v), incubando-se por 3, 6, 9 e 12 h a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa.

2.5.1. EXTRACÇÃO DO RNA TOTAL

Das culturas preparadas anteriormente (ponto 2.5) recolheram-se os sobrenadantes para tubos BD Falcon de 15 mL (BD Biosciences) bem como as células obtidas por tripsinização utilizando 1,5 mL de tripsina, 5 min a 37 °C, 5 % (v/v) CO₂ e 99 % de humidade relativa. Centrifugaram-se os tubos durante 5 min a 2500 rpm, lavaram-se as células com 1 mL de PBS 1x gelado e procedeu-se a uma nova centrifugação nas condições anteriores, eliminando-se os sobrenadantes. De seguida, realizou-se a extracção do RNA total utilizando o *Kit SV Total RNA Isolation System* (Promega), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Determinou-se a concentração de RNA espectrofotometricamente a 260 nm no *NanoDrop2000* (Thermo Scientific). A pureza do RNA foi igualmente avaliada recorrendo ao *NanoDrop* através das razões Abs₂₆₀/Abs₂₈₀ e Abs₂₆₀/Abs₂₃₀. A razão Abs₂₆₀/Abs₂₈₀ avalia a contaminação por proteína e deverá ter um valor de aproximadamente 2,0 para amostras puras. A razão Abs₂₆₀/Abs₂₃₀ deve apresentar um valor entre 1,8 e 2,2 (SV Total RNA Isolation System Kit, TM048, Promega 2009). As amostras de RNA total foram armazenadas a -80 °C até posterior utilização.

2.5.2. SÍNTESE DE cDNA

A síntese de cDNA foi efectuada utilizando o *Kit cDNA Synthesis* (Bioline, Londres, Reino Unido), seguindo as instruções do fabricante. A quantificação do cDNA foi realizada no *NanoDrop*, por leitura da absorvância a 260 nm. Avaliou-se a pureza do cDNA no *NanoDrop* através das razões Abs₂₆₀/Abs₂₈₀ e Abs₂₆₀/Abs₂₃₀. O cDNA foi armazenado a -20 °C até à sua utilização.

2.5.3. PCR EM TEMPO REAL (RT-PCR)

Para a análise da variação da expressão dos genes acima referidos na ausência e na presença do composto ZM V, recorreu-se à técnica de RT-PCR e utilizou-se como molde o cDNA sintetizado anteriormente. O gene *rRNA18S5*, que codifica para o RNA ribossomal 18S (rRNA 18S), foi usado como controlo interno para normalização do valor de expressão das amostras. A sequência de *primers forward* e *reverse* (oligonucleótidos sintéticos) (Metabion, Martinsried, Deutschland) e o tamanho dos fragmentos amplificados encontram-se referenciados na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 – Sequências de *primers forward* e *reverse* e tamanho do amplicão esperado.

Genes	Primer Forward (5'-3')	Primer Reverse (5'-3')	Amplicão (pb)	Referência
<i>rRNA18S5</i>	GTAACCCGTTGAACCCATT	CCATCCAATCGGTAGTAGCG	151	Kogure <i>et al.</i> , 2011
<i>BAX</i>	TGCTTCAGGGTTTCATCCAGGA	ACGGCGGCAATCATCCTCTG	172	Li <i>et al.</i> , 2010
<i>BCL-2</i>	CTTCGCCGAGATGTCCAGCCA	CGCTCTCCACACACATGACCC	152	
<i>CASP3</i>	TACCAGTGGAGGCCGACTTC	GCACAAAGCGACTGGATGAAC	103	

Utilizou-se o *Kit SensiFAST™ SYBR No-ROX* (Bioline) procedendo-se a algumas alterações ao protocolo do fabricante: 5 µL de 2x SensiFAST SYBR No-ROX Mix, 85 ng de cDNA molde e concentrações variáveis de *primers forward* e *reverse* de acordo com o gene alvo (Tabela 2.3), perfazendo as soluções com água destilada e autoclavada até um volume reaccional de 10 µL.

Tabela 2.3 – Temperatura de *annealing* e concentrações utilizadas de *primers forward* e *reverse* para amplificação dos genes *rRNA18S5*, *BAX*, *BCL-2* e *CASP3*.

Genes	Primer forward e reverse (pmol/µL)	Temperatura de <i>annealing</i> (°C)
<i>rRNA18S5</i>	0,24	59
<i>BAX</i>	0,24	62
<i>BCL-2</i>	0,15	65
<i>CASP3</i>	0,24	59

A amplificação foi realizada no aparelho LightCycler® 480 (Roche, Basel, Suíça), seguindo o programa descrito na Tabela 2.4.

Tabela 2.4 – Condições reaccionais utilizadas para a reacção de RT-PCR para os genes *rRNA18S5*, *BAX*, *BCL-2* e *CASP3*.

Fase	Temperatura	Tempo	Ciclos
Activação da polimerase	95 °C	2 min	1
Desnaturação	95 °C	5 s	40
<i>Annealing</i>	Dependente do gene (tabela 2.3)	10 s	
Extensão	72 °C	10 s	

Os produtos resultantes da amplificação foram observados através de electroforese em gel de agarose (Bioline) a 2 % (p/v), corado com 2 % (v/v) de GelRed (10000x; Biotarget, Portugal), a 110 V durante 50 min, em solução tampão TAE 1x (composição para 1 L de TAE 10x: 48,4 g Tris-base, 3,72 g EDTA, 11,42 mL ácido acético glacial, pH 8,0). Como marcador de pesos moleculares foi utilizado o *HyperLadder IV* (Bioline). O gel foi seguidamente visualizado sob luz UV num transiluminador *UVipure* (UVITEC, Cambridge, Reino Unido), fotografado com a câmara *Kodak AlphaDigiDoc* (Alpha Innotech, Califórnia, EUA), e a imagem adquirida pelo *software* AlphaEaseFC (Alpha Innotech).

Os dados do RT-PCR foram analisados recorrendo a um método que utiliza os valores de *Ct* para comparar amostras tratadas com um composto com amostras não tratadas (Livak e Schmittgen, 2001). Em primeiro lugar relaciona-se o gene referência de cada amostra com os seus genes alvo através da equação (3) (Alshatwi, 2010):

$$(3) \quad \Delta Ct = Ct_{(gene\ alvo)} - Ct_{(gene\ controlo)}$$

Para determinar o nível de expressão relativo utiliza-se a equação (4) (Alshatwi, 2010):

$$(4) \quad \Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(amostra\ tratada)} - \Delta Ct_{(amostra\ não\ tratada)}$$

De seguida, a expressão dos genes alvo é calculada através de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Alshatwi, 2010). Desta forma, os dados são apresentados como alterações na expressão dos genes normalizada com uma referência interna e com um controlo não tratado (Livak e Schmittgen, 2001).

2.6. PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR

Este ensaio foi realizado na linha celular tumoral HCT116 que foi cultivada em frascos de cultura de 25 cm² numa densidade celular de 1x10⁵ células/mL e incubadas a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa.

As células foram sujeitas a um duplo bloqueio com timidina para sincronização das mesmas no início da fase S do ciclo celular, seguindo o protocolo descrito por Borralho e colaboradores (2009). Assim, após 8h da cultura das células nas condições anteriores adicionou-se ao meio de cultura 2 mM de timidina (Sigma), incubando-se por 14 h a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa, para a realização do 1º bloqueio. Posteriormente, substituiu-se o meio com timidina por novo meio de cultura, no qual as células foram mantidas durante 10 h. Adicionou-se novamente 2 mM de timidina (2º bloqueio) seguido de 14 h de incubação a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa. Removeu-se novamente o meio com timidina e adicionou-se 0,1 % (v/v) de DMSO (controlo) e o composto ZM V na concentração de 0,05 µM (solução preparada por diluição da solução *stock* em meio de cultura) incubando-se por 8 e 24 h a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa. As células de uma das culturas foram fixadas, de acordo com o protocolo descrito de seguida, após concluído o segundo bloqueio para serem utilizadas como controlo do método de sincronização.

As células colhidas por tripsinização (5 mL de tripsina, 5 min a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa) foram centrifugadas a 2000 rpm durante 5 min. Eliminaram-se os sobrenadantes, lavaram-se as células com 1 mL de PBS 1x frio e centrifugaram-se novamente a 2000 rpm durante 5 min, com eliminação dos sobrenadantes. Os sedimentos foram ressuspensos em 1 mL de PBS 1x frio e, de seguida, adicionou-se 1 mL de uma solução de etanol a 80 % (armazenada a -20 °C), gota a gota, com agitação suave em vórtex, de forma a fixar as células. As amostras foram colocadas em gelo por 30 min e depois armazenadas a 4 °C durante pelo menos 18 h. Os tubos foram então centrifugados a 2000 rpm durante 5 min, eliminou-se o sobrenadante e adicionou-se 1 mL de uma solução iodeto de propídio a 50 µg/mL incubando-se na ausência de luz durante 30 min. A marcação com iodeto de propídio foi analisada por citometria de fluxo no citómetro de fluxo *Attune® Acoustic Focusing Flow Cytometer* pela aquisição de 10000 eventos por amostra e a análise dos resultados foi realizada através do *Attune® Cytometric software*. O ensaio foi realizado em triplicado.

Este ensaio foi realizado igualmente no âmbito de um protocolo estabelecido com a Professora Doutora Paula Videira.

2.7. ESTUDOS DE INTERACÇÃO COM O DNA

2.7.1. ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO

A espectroscopia de absorção é uma das técnicas mais utilizadas para o estudo da interacção entre um composto e o DNA (Shahabadi *et al.*, 2011). Realizaram-se ensaios de espectroscopia de absorção utilizando-se o DNA de timo de bezerro (CT-DNA, do inglês *Calf Thymus*-DNA; Invitrogen) cuja concentração, por nucleótido, foi determinada por leitura de absorvância a 260nm, no *NanoDrop*, utilizando o coeficiente de extinção molar de 6600 M⁻¹ cm⁻¹ aos 260 nm (Efthimiadou *et al.*, 2010) e aplicando a equação de Lambert-Beer (equação (5)):

$$(5) \quad A = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

sendo A a absorvância, ε o coeficiente de extinção molar em mol⁻¹.L.cm⁻¹, l o percurso óptico em cm e c a concentração da amostra em mol.L⁻¹ (Schmid, 2001).

De seguida, foram preparadas várias soluções contendo tampão 5 mM Tris-HCl (Merck), 50 mM NaCl (Panreac), pH 7,02, adicionando-se o CT-DNA em concentrações crescentes (de 0 a 27 μ M). A cada uma das soluções foram adicionados 0,01 % (v/v) de DMSO (solução de referência) ou composto numa concentração fixa de 5 μ M, sendo estas incubadas a 37 °C por 24 h. Os espectros de absorção na região do UV-Visível (entre 230 e 400 nm) foram adquiridos num espectrofotómetro Evolution 300 UV-Vis (Thermo Scientific).

Os valores de absorvância a 287 nm (correspondente ao comprimento de onda no qual se verifica o máximo de absorvância para o composto) foram corrigidos por subtracção dos valores de absorvância no mesmo comprimento de onda obtidos para o controlo (0,01 % (v/v) de DMSO). A partir dos valores de absorvância já corrigidos, foi então possível determinar o valor da constante de afinidade para o DNA (K_b) pela aplicação da equação (6):

$$(6) \quad \frac{[DNA]}{(\varepsilon_a - \varepsilon_f)} = \frac{[DNA]}{(\varepsilon_b - \varepsilon_f)} + \frac{1}{K_b(\varepsilon_b - \varepsilon_f)}$$

na qual [DNA] corresponde à concentração de DNA, ε_a ao coeficiente de extinção molar aparente, ε_f ao coeficiente de extinção molar do composto no estado livre, ε_b ao coeficiente de extinção molar do composto ligado ao DNA e K_b à constante de afinidade para o DNA (M⁻¹) (Aslanoglu, 2006).

O valor de ε_a foi calculado a partir da razão $A_{obs}/[composto]$ e o valor de ε_f foi obtido através da equação de Lambert-Beer, pela determinação do declive de uma recta de calibração ajustada à dependência da absorvância a 287 nm com a concentração de composto (1 a 10,4 μ M) em tampão 5 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 7,02 (Shahabadi *et al.*, 2011). A constante de ligação K_b foi determinada pela razão entre o declive ($1/(\varepsilon_b - \varepsilon_f)$) e a ordenada na origem ($1/K_b(\varepsilon_b - \varepsilon_f)$) de uma recta resultante de um ajuste linear à representação de $[DNA]/(\varepsilon_a - \varepsilon_f)$ em função de [DNA] (equação (6)) (Shahabadi *et al.*, 2011). O ensaio foi realizado em triplicado.

2.7.2. INTERACÇÃO COM A MOLÉCULA DE DNA

2.7.2.1. CULTURA DE *ESCHERICHIA COLI* E EXTRACÇÃO DE DNA PLASMÍDICO (pBSKII)

As células de *Escherichia coli* (*E. coli*) da estirpe DH5 α transformadas com o plasmídeo pBluescript II SK+ (pBSK II; Agilent Technologies, Califórnia, EUA) (utilizado no ensaio de clivagem do DNA) foram cultivadas em meio de cultura *Luria-Bertani* (LB; Applichem, Darmstadt, Alemanha) suplementado com ampicilina (100 μ g/mL; Bioline), numa incubadora G25 (News Brunswick Scientific, New Jersey, EUA) com agitação orbital de 250 rpm, por um período de 16 h a 37 °C.

De seguida, o DNA plasmídico pBSK II foi extraído utilizando o *kit* de extracção NZYMiniprep (Nzytech, Portugal), segundo as instruções do fabricante, à excepção do passo de eluição que ocorreu pela adição do tampão 50 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, pH 7,25, pré-aquecido a 70 °C. O DNA plasmídico foi quantificado por espectrofotometria a 260 nm, no *Nanodrop*. A pureza do DNA plasmídico foi também avaliada de igual forma, através das razões Abs_{260}/Abs_{280} e Abs_{260}/Abs_{230} . A razão Abs_{260}/Abs_{280} deve apresentar um valor de aproximadamente 1,8 em amostras puras (NanoDrop Technical Support Bulletin, T009, NanoDrop Technologies Inc. 2007). A razão Abs_{260}/Abs_{230} deve apresentar um valor entre 2,0 e 2,2 (NanoDrop Technical Support Bulletin, T009, NanoDrop Technologies Inc. 2007). A integridade do DNA plasmídico foi avaliada através de electroforese em gel de agarose a 0,8 % (p/v), em solução tampão TAE 1x, corado com 2 % (v/v) de *GelRed*.

2.7.2.2. ESTUDOS DE CLIVAGEM DE DNA PLASMÍDICO

Incubaram-se 200 ng de DNA plasmídico pBSK II na presença de 9,5 % (v/v) de DMSO (controlo) ou de concentrações crescentes do composto ZM V (5-100 μ M), em tampão 5 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 7,2, num volume final de reacção de 20 μ L por amostra. As soluções foram incubadas por 24 h a 37 °C e, posteriormente, sujeitas a electroforese em gel de agarose a 0,7 % (p/v), em solução tampão TAE 1x, a 70 V durante 2 h e 30 min. Como marcador de pesos moleculares utilizou-se λ DNA/*HindIII* (Fermentas, Maryland, EUA). De seguida, o gel foi corado numa solução de Brometo de Etídio (Invitrogen) a 0,05 μ g/mL em 100 mL de água destilada durante 30 min com agitação e foi retirado o excesso de corante em 100 mL de água destilada por 5 min com agitação. O gel foi visualizado num transiluminador *UVipure* (UVITEC, Cambridge, Reino Unido) e a aquisição de imagem feita através de uma câmara *Kodak AlphaDigiDoc* (Alpha Innotech, Kasendorf, Alemanha) e do *software AlphaEaseFC* (Alpha Innotech). O ensaio foi realizado em triplicado.

2.7.2.3. ENSAIO DE RETARDAMENTO DA MOBILIDADE ELECTROFORÉTICA (EMSA) DE pDNA DEPENDENTE DO TEMPO

Prepararam-se soluções contendo 200 ng de DNA plasmídico pBSK II na presença de 9,5 % (v/v) de DMSO (controlo) ou do composto nas concentrações de 10 e 50 μ M, em tampão 5 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 7,2, num volume final de reacção 20 μ L por amostra. As soluções de composto foram incubadas a 37 °C durante diferentes períodos de tempo 1, 5, 20, 24 e 48 h e o controlo incubado igualmente a 37 °C durante 48 h. Posteriormente, adicionaram-se 5 μ L de tampão de deposição contendo 25 mM de EDTA a cada solução, de forma a interromper a reacção do composto com o DNA, sendo colocadas seguidamente em gelo durante 30 min e armazenadas a 4 °C. A electroforese em gel de agarose e a aquisição das imagens foi realizada com descrito anteriormente (ponto 2.7.2.2). Para o cálculo dos valores de mobilidade electroforética utilizou-se o *software GelAnalyzer* (www.gelanalyzer.com). O ensaio foi realizado em triplicado.

2.8. ELECTROFORESE EM GEL DE CÉLULA ÚNICA OU ENSAIO COMET

O Ensaio *Comet* é um método sensível e rápido para a identificação de quebras simples ou duplas no DNA, representando assim um eficiente teste de genotoxicidade (Collins *et al.*, 2008; Collins *et al.*, 1997). O ensaio baseia-se no facto de que fragmentos de DNA de menores dimensões resultantes de quebras no DNA, levam à migração dos mesmos a partir da cabeça do cometa, levando assim à formação de uma cauda (Liao *et al.*, 2009; Rojas *et al.*, 1999). Assim, a distância de migração é usada para avaliar a extensão dos danos do DNA, bem como a quantidade de DNA na cauda do cometa e, consequentemente, de uma indicação das quebras induzidas (Olive e Banáth, 2006; Fairbairn *et al.*, 1995).

2.8.1. PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS

Para o Ensaio *Comet* devem ser utilizadas lâminas com extremidade fosca para que possam ser facilmente identificadas. Primeiro, procedeu-se à limpeza das lâminas com etanol a 70 % sendo depois secas com papel absorvente. Derreteu-se a agarose de elevado ponto de fusão (HMPA) a 1,5 % (p/v) e colocou-se num copo de Coplin no qual se mergulhou as lâminas, sendo retiradas de imediato e limpa a parte inferior das mesmas. Deixou-se a agarose polimerizar numa estufa a 37 °C durante 48 h.

2.8.2. EXPOSIÇÃO DAS CÉLULAS AO COMPOSTO E PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS

Para a realização do ensaio foi utilizada a linha tumoral HCT116, cujas células foram cultivadas em placas de 35 mm (Orange Scientific) numa densidade celular de 5×10^5 células/mL e incubadas durante 24 h a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa. Foi adicionado o composto ZM V na concentração de 0,1 μ M (solução preparada por diluição da solução *stock*

em meio de cultura) e 0,1 % (v/v) de DMSO (controlo negativo). Preparou-se ainda um segundo controlo negativo no qual não se adicionou composto nem DMSO. As placas foram incubadas durante 24 h a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa. Como controlo positivo foi utilizado o peróxido de hidrogénio (H₂O₂; Sigma) a 0,05 % (v/v), incubando-se por um período de 30 min à temperatura ambiente.

Para obtenção das células o meio de cultura foi removido e adicionou-se 1 mL de PBS 1x gelado, recolhendo as células através do método de *scraping*. A suspensão celular foi centrifugada a 700 xg por 2 min, eliminando-se os sobrenadantes. As células foram lavadas com 1 mL de PBS 1x gelado e centrifugadas novamente nas mesmas condições, eliminando-se os sobrenadantes. O sedimento foi ressuspensão em 1 mL de PBS 1x gelado e procedeu-se à contagem das células através do método de exclusão pelo azul de *Trypan*, descrito anteriormente (ponto 2.3.1). Preparou-se uma solução com densidade celular de 1x10⁵ células/mL, em 1 mL de PBS 1x gelado.

Para a realização do ensaio *Comet* foram preparadas previamente as soluções de lise, alcalina e de neutralização, sendo armazenadas a 4 °C.

As amostras foram preparadas numa proporção de 1:10 de suspensão celular para a agarose de baixo ponto de fusão (LMPA; 0,1 g de agarose em 10 mL de PBS). Destas soluções foram pipetados 90 µL para uma lâmina com HMPA (preparadas previamente), cobrindo-as com uma lamela de forma a espalhar uniformemente a amostra. As lâminas foram colocadas na horizontal a 4 °C durante 30 min, na ausência de luz. Posteriormente, as lamelas foram removidas e as lâminas colocadas num copo de Coplin durante 1 h a 4 °C, na ausência de luz, expostas a 100 mL de uma solução de lise constituída por 13,2 g de NaCl (VWR, BDH Prolabo), 18,6 g de EDTA, 1,25 mL de Tris Base (4 M; Calbiochem) e suplementada imediatamente antes da utilização com 10 mL DMSO e 1 mL de Triton X-100, em água destilada, pH 10. A solução de lise foi removida e substituída por uma solução alcalina (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH>13) na qual as lâminas permaneceram durante 30 min a 4 °C, na ausência de luz.

2.8.3. ELECTROFORESE ALCALINA

As lâminas foram transferidas para uma tina de electroforese contendo a solução alcalina a 4 °C, apenas o suficiente para cobrir as lâminas, e colocadas paralelamente à direcção da corrida. Foi aplicada uma voltagem de 25 V (400 mA) durante 30 min a 4 °C.

Posteriormente, as lâminas foram colocadas num copo de Coplin contendo uma solução de neutralização (400 mM Tris Base, pH 7,5) durante 15 min a 4 °C, na ausência de luz, e foram fixadas em metanol incubando durante 15 min a 4 °C, na ausência de luz. As lâminas foram deixadas a secar ao ar durante alguns minutos e depois colocadas numa estufa a 37 °C, *overnight*.

2.8.4. ANÁLISE DAS LÂMINAS PARA OBSERVAÇÃO DA FORMAÇÃO DE COMETAS

Para visualização dos cometas, as lâminas foram reidratadas em água destilada durante 30 min, na ausência de luz, e posteriormente foram coradas com 20 µL de brometo de etídio (2 mg/µL), dispondo-se por cima uma lamela. As lâminas foram observadas num microscópio de fluorescência *Leica DFC 480* (Leica Microsystems, Cambridge, Reino Unido), e as imagens adquiridas através do programa *Optika Vision Pro* (Optika, Itália). Os resultados foram analisados através do programa *CometScore* (Tritek; <http://autocomet.com>) contabilizando pelo menos 100 cometas por lâmina.

2.9. PROTEÓMICA

2.9.1. EXPOSIÇÃO DAS CÉLULAS AO COMPOSTO

As células da linha celular tumoral HCT116 foram cultivadas em frascos de cultura de 25 cm² numa densidade celular de 2×10^5 células/mL e incubadas a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa durante 24 h. Posteriormente, as células foram tratadas com 2 mL de uma solução controlo de DMSO a 0,15 % (v/v) e 2 mL de uma solução do composto ZM V numa concentração de 0,07 µM (solução preparada por diluição da solução *stock* em meio de cultura), e incubadas 24 h a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa. Posteriormente transferiram-se para tubos de centrifuga as células tripsinizadas, centrifugaram-se por 5 min a 2500 rpm e lavaram-se três vezes com 1 mL de PBS 1x gelado, eliminando de seguida os sobrenadantes.

2.9.2. EXTRACÇÃO, PRECIPITAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO EXTRACTO DE PROTEÍNA TOTAL

Para extracção do extracto de proteína total preparou-se, em gelo, uma solução de lise constituída por 1x de inibidores de fosfatases (PhosStop, Roche, Basel, Suíça), 1x de inibidores de proteases (complete Mini, Roche), 1 % (p/v) de ditioneitol (DTT; Promega), 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF; Sigma), em tampão de lise NaCl-Tris-EDTA (150 mM NaCl; 50 mM Tris; pH=8; 5 mM EDTA) e 2 % (p/v) de NP-40 (ThermoScientific). As células obtidas foram ressuspensas em 200 µL desta solução e incubou-se em gelo cerca de 1 h. Ao fim desse tempo, observaram-se preparações de 5 µL das amostras ao microscópio de fluorescência Olympus BX51 para verificar se as células se encontravam lisadas e, foram vortexadas cerca de 1 min para promover a lise completa das células. De seguida, centrifugou-se a 14000 xg durante 10 min e recuperaram-se os sobrenadantes.

Para precipitação e purificação dos extractos de proteína total utilizou-se o *2-D Clean-Up Kit* (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante, até ao passo de adição do *wash buffer* e do *wash additive*, em que foi efectuada uma incubação *overnight* a -20 °C. Posteriormente, ressuspenderam-se os sedimentos em 150 µL de solução de reidratação constituída por 120 µL de tampão de reidratação (8 M de Ureia

(Sigma), 2 % (p/v) de CHAPS (GE Healthcare), 0,5 % (v/v) de tampão IPG pharmalyte pH 3-10 (GE Healthcare) e vestígios de azul de bromofenol (Riedel-de Haël, Saint Louis, EUA)), e ainda 0,6 µL de DTT a 10 % (p/v), 0,6 µL de PMSF a 100 mM, 15 µL de inibidores de fosfatases e 15 µL de inibidores de proteases, adicionados imediatamente antes da aplicação da solução de reidratação. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente durante pelo menos 2 h. Por fim, centrifugaram-se as amostras a 14000 xg por 15 min, recuperando os sobrenadantes que contêm as proteínas solubilizadas.

2.9.3. QUANTIFICAÇÃO DO EXTRACTO DE PROTEÍNA TOTAL

O extracto de proteína total foi quantificado imediatamente antes da focagem isoelectrica utilizando o *Pierce Protein Assay Kit* (ThermoScientific). Traçou-se uma recta de calibração de padrões Albumina sérica bovina (BSA, do inglês *Bovine serum albumin*) com concentrações desde 125-1000 µg/mL, preparados pela adição de 50 µL de cada uma das soluções padrão e 750 µL do reagente de Pierce. Para quantificação das amostras foram preparadas soluções usando 10 µL de amostra, 90 µL de água destilada e 1,5 mL de reagente de Pierce. As soluções permaneceram durante 5 min à temperatura ambiente. De seguida, mediu-se a absorvância a 660 nm no *NanoDrop2000* utilizando uma solução de 50 µL de água destilada em 750 µL de reagente de Pierce como zero da recta de calibração.

2.9.4. ELECTROFORESE BIDIMENSIONAL (2-DE)

A electroforese bidimensional permite a separação das proteínas através de duas etapas: a focagem isoelectrica e a electroforese em géis de SDS-PAGE. A focagem isoelectrica, ou 1ª dimensão, permite a separação das proteínas consoante o seu ponto isoelectrico. A 2ª dimensão, realizada pela utilização de géis SDS-PAGE, permite a separação das proteínas de acordo com a sua massa molecular.

2.9.5. FOCAGEM ISOELÉCTRICA

Para a realização da focagem isoelectrica utilizaram-se 200 µg do extracto proteico total. O volume correspondente aos 200 µg de extracto de proteína total foi distribuído ao longo do suporte de tiras de 7 cm IPG *strip holder* (GE Healthcare), colocando-se por cima uma tira *Immobiline Dry strip* pH 3-10 NL de 7 cm (GE Healthcare), de modo que o gel ficasse em contacto com a amostra e não se formassem bolhas entre o gel e a amostra. Selou-se o suporte com 750 µL de *Drystrip Cover Fluid* (GE Healthcare) e colocou-se a respectiva tampa. Os suportes foram posteriormente dispostos no sistema de isofocagem ETTAN IPGphor 3 IEF (GE Healthcare), e a focagem isoelectrica foi realizada através do programa indicado na Tabela 2.5.

Tabela 2.5 – Programa utilizado na focagem isoelétrica

Passo	Duração	Voltagem (V)	Temperatura (°C)
1	12 h	30	20
2	30 min	100	
3	30 min	500	
4	30 min	1000	
5	1 h	5000	

2.9.6. SDS-PAGE

Antes da realização dos géis SDS-PAGE as tiras foram removidas dos suportes e equilibradas, durante 15min com agitação horizontal, em 5 mL de solução de equilíbrio (1,5 M de Tris-HCl pH 8,8 (Merck), 360,35 g/L de ureia (Scharlau), 354 mL/L de glicerol 30 % (v/v) (Panreac), 20g/L de dodecil-sulfato de sódio (SDS, do inglês: *Sodiumdodecyl sulfate*; Riedel-de Haën), vestígios de azul de bromofenol) suplementada com 1% (p/v) de DTT. De seguida, as tiras foram transferidas para uma nova solução de equilíbrio suplementada com 2,5% (p/v) de iodoacetamida (GE Healthcare) onde permaneceram durante 15 min com agitação horizontal.

Para a segunda dimensão da electroforese bidimensional, prepararam-se géis de poli(acrilamida a 12,5 % (v/v) contendo: 4 mL de acrilamida/bis-acrilamida 30 % (Merck), 2,5 mL de tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8,8; 3,5 mL água destilada, 75 µL de persulfato de amónia (APS, do inglês: *Ammonium Persulfate*; Biorad, Califórnia, EUA) e 10µL tetrametiletilenodiamina (TEMED, do inglês *tetramethylethylenediamine*; Sigma). O sistema de SDS-PAGE Mini-PROTEAN®3 System (BioRad) foi previamente montado e os géis colocados nos moldes, selando-os com água destilada, e deixando-os polimerizar. Eliminou-se a água com inversão dos moldes e papel de filtro e as tiras foram colocadas por cima dos géis de poli(acrilamida, juntamente com o marcador de pesos moleculares HyperPAGE I (Bioline), selando-se de seguida com uma solução de agarose 0,5 % (p/v) (Lonza, Basel, Suíça) em tampão de electroforese (3,79 g/L de Tris-base, 18 g/L de glicina (Panreac), 1,25 g/L SDS e vestígios de azul de bromofenol). Iniciou-se a electroforese a 30 V durante 30 min e seguidamente a 1500 V até o azul de bromofenol ser eliminado para o tampão de electroforese.

2.9.7. REVELAÇÃO DOS GÉIS

Os géis resultantes foram corados a quente (2 min no microondas a 900 W) numa solução contendo três pastilhas de *PhasTGel™ Blue R* (Coomassie R350) (GE Healthcare) dissolvidas em 1 L de ácido acético a 10 % (v/v) (Panreac) em água destilada, sendo aquecidos em intervalos de 20 min por três vezes. Para a revelação dos géis realizaram-se várias lavagens com água destilada, aquecida nas mesmas condições referidas anteriormente. Os géis foram digitalizados através do *scanner* PIXMA M250 (Canon) e analisados no programa Melanie 7.0 (GeneBio, Genebra, Suíça). A análise foi realizada por detecção automática dos *spots*, identificação dos *spots* de proteínas, correspondência dos *spots* entre os diferentes géis e

determinação da intensidade/expressão de cada *spot*. A variação dos níveis de expressão de cada proteína foi calculada a partir da razão entre a intensidade de cada um dos *spots* das amostras pela intensidade de cada um dos *spots* dos controlos. Os *spots*, cuja expressão foi considerada significativa ($\leq 0,7$ e $\geq 1,5$), foram excisados dos géis e analisados por espectrometria de massa Maldi-TOF.

O ensaio foi realizado em triplicado.

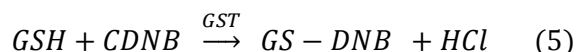
2.10. DETECÇÃO DE ROS

Neste ensaio foram utilizadas as células da linha tumoral HCT116. O cultivo e a exposição a 0,05 μM do composto ZM V e a extracção da proteína total foram realizados segundo os protocolos descritos anteriormente nos pontos 2.9.1 e 2.9.2. A proteína total foi mantida como extracto proteico total do qual foi efectuada a sua quantificação de acordo com o descrito no ponto 2.9.3. A detecção de ROS foi realizada tendo em conta a actividade da enzima de *stress* oxidativo glutathiona S-transferase, e ainda a detecção de peroxidação lipídica.

2.10.1. ENSAIO DA GLUTATHIONA S-TRANSFERASE

A glutathiona S-transferase (GST) faz parte de um conjunto de enzimas de destoxificação que catalisa a conjugação de xenobióticos electrofílicos à glutathiona reduzida (GSH) de forma a facilitar a sua remoção da célula (Burns *et al.*, 2005; Sheehan *et al.*, 2001; Tamaki *et al.*, 1999).

Para a realização deste ensaio utilizou-se o *Glutathione S-Transferase (GST) Assay Kit* (Sigma), que utiliza o substrato CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) para medir a actividade da GST. A GST catalisa a conjugação do CDNB à L-glutathiona através do seu grupo tiol (reacção 6) (Glutathione S-transferase (GST) Assay Kit, CS0410, Sigma).



O produto da reacção (GS-DNB) absorve a 340 nm e, como tal, o aumento da absorvância é directamente proporcional à actividade da GST na amostra (Glutathione S-Transferase (GST) Assay Kit, CS0410, Sigma).

O protocolo foi seguido como descrito pelo fabricante para o ensaio numa placa de 96 poços. Primeiramente, preparou-se a solução do substrato constituída por 9,8 mL de *Dulbecco's Phosphate Buffered saline*, 0,1 mL de 200 mM *L-Glutathione reduced* e 0,1 mL de 100 mM CDNB. De seguida, adicionaram-se 180 μL da solução de substrato e 20 μL de cada amostra proteica ou controlo de GST (GST de fígado de cavalo como controlo positivo), usando-se como branco 200 μL de solução do substrato. Realizou-se a leitura das absorvâncias a 340 nm imediatamente após a preparação das reacções, num leitor de microplacas Infinite 200 PRO microplate reader (TECAN), retirando os valores de absorvância de 1 min em 1 min durante 8 min, de três replicados.

O valor da absorvância a 340 nm por minuto (A_{340}/min) foi obtido pela determinação do declive de uma recta de calibração ajustada à dependência da A_{340} com o tempo (min). A actividade da GST é calcula através da equação (7):

$$(7) \quad \frac{A_{340}/\text{min} \times V(\text{mL})}{\varepsilon_{\text{mM}} \times V_{\text{enz}}(\text{mL})} = \mu\text{mol}/\text{mL}/\text{min}$$

Onde V corresponde ao volume da reacção, ε_{mM} o coeficiente de extinção molar para o CDNB conjugado aos 340 nm ($5,3 \text{ mM}^{-1}$) e V_{enz} o volume de enzima da amostra em estudo (Glutathione S-Transferase (GST) Assay Kit, CS0410, Sigma). Os resultados foram, por fim, normalizados relativamente à concentração do extracto proteico total.

2.10.2. ENSAIO DE ESPÉCIES REACTIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO – PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

Para além das proteínas e dos ácidos nucleicos, também os lípidos são alvos da acção oxidativa de ROS. A peroxidação lipídica provoca alterações na organização membranar, perda de função e modificações em proteínas e bases do DNA (Niki, 2009).

O protocolo seguido neste ensaio encontra-se descrito por Correia e colaboradores (2003). A detecção de peroxidação lipídica através da detecção de espécies reactivas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, do inglês, *thiobarbituric acid reactive species*), baseia-se na existência do malondialdeído (MDA), um composto resultante da peroxidação lipídica cuja reacção com o ácido tiobarbitúrico (TBA) (reacção 6) permite a sua detecção através da leitura da absorvância a 532 nm.



Para realização deste ensaio, foram utilizados 5 μL de cada amostra proteica e adicionados a 45 μL de tampão fosfato (50 mM de NaH_2PO_2 , pH 7,0) (Sigma), contendo 2 mM de EDTA (Riedel-Haën), 12,5 μL de uma solução de 8,1 % de SDS (Merk), 93,5 μL de uma solução de 20 % de ácido tricloroacético (TCA; Merk) a pH 3,5, 93,5 μL de uma solução de 1 % de TBA (Merk) e 50,5 μL de água MiliQ. Procedeu-se a um aquecimento durante 10 min em um banho-maria a 100 °C, sendo posteriormente parada a reacção em gelo. Os controlos foram preparados como descrito anteriormente.

Adicionaram-se 62,5 μL de água *MiliQ* e 312,5 μL da mistura *n*-butanol:piridina (na proporção de 15:1 (v/v); Merk), homogeneizaram-se as soluções por vortexação e procedeu-se a uma centrifugação a 10000 xg durante 5 min. Do sobrenadante resultante, retiram-se 150 μL e aplicaram-se a cada poço de uma placa de 96 poços, em duplicado.

Procedeu-se à leitura da absorvância das soluções a 532 nm num leitor de microplacas Infinite 200 PRO microplate reader (TECAN).

Traçou-se a recta de calibração da absorvância em função da concentração de MDA, a partir da qual é possível calcular a concentração de MDA presente na amostra, através da diluição de soluções padrão (0 a 0,3 μM de TBARS) em água destilada. Os resultados foram, por fim, normalizados relativamente à concentração do extracto proteico total.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO

A avaliação do potencial anti-proliferativo induzido por compostos é geralmente realizado por recurso ao método do MTS que quantifica a actividade metabólica das células (Lupold *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2010), uma vez que, o MTS é reduzido a formazano, através de enzimas desidrogenases que apenas se encontram em células metabolicamente activas. A quantidade de formazano produzido é directamente proporcional ao número de células viáveis em cultura (CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, G5421, Promega 2012).

Procedeu-se ao estudo da citotoxicidade do composto ZM V nas células das linhas tumorais HCT116, HepG2 e MCF-7, correspondentes ao carcinoma colorectal, carcinoma hepatocelular e adenocarcinoma da mama, respectivamente. A exposição das células a concentrações crescentes de composto revelou uma diminuição gradual da viabilidade celular, representada na Figura 3.1. A partir destes resultados foi possível determinar o valor de IC₅₀ que corresponde à concentração de composto necessária para reduzir a viabilidade celular em 50 % relativamente ao controlo. Os valores de IC₅₀ absolutos podem ser retirados directamente dos gráficos representados na Figura 3.1. Os valores de IC₅₀ relativos foram calculados por recurso ao programa *GraphPad* que traça uma curva dose-resposta com um patamar superior e um patamar inferior, sendo o valor de IC₅₀ relativo correspondente à concentração de composto no ponto médio entre os dois patamares, tendo sido obtidos os valores de 0,065 µM para HCT116, 0,187 µM para HepG2 e 5,401 µM para MCF-7. Estes resultados demonstram que o composto ZM V apresenta maior actividade anti-proliferativa nas células HCT116 e menor actividade para as MCF-7. A cisplatina apresenta valores de IC₅₀ de 15,3 e 4,2 µM para as linhas tumorais HCT116 e HepG2, respectivamente (Silva, 2012). Desta forma, é observável que o composto ZM V apresenta maior actividade anti-proliferativa nestas linhas celulares comparativamente à cisplatina, uma vez que apresenta valores de IC₅₀ inferiores. Para a DOX foi determinado por MTS um IC₅₀ de 0,42 µM para a linha HCT116 e de 0,11 µM para a linha MCF-7 (Silva, 2012; Yu *et al.*, 2012). Assim, o ZM V revela maior actividade anti-proliferativa do que a DOX para as células HCT116, mas a sua actividade é drasticamente menor em células MCF-7, apresentando-se pouco vantajoso para aplicação neste tipo de cancro.

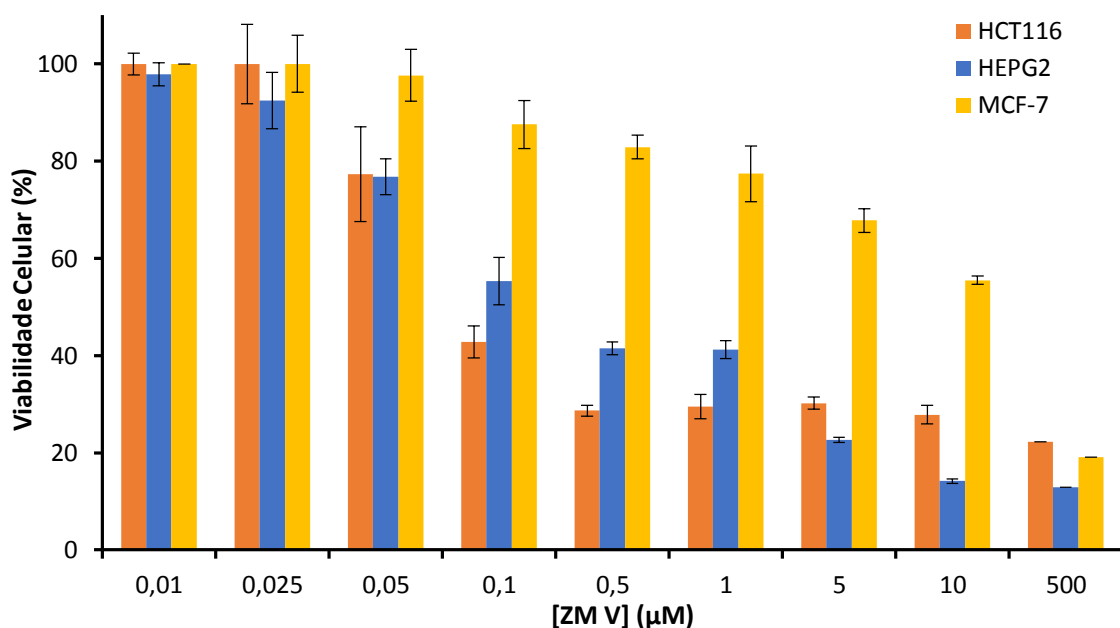


Figura 3.1 – Viabilidade celular das linhas tumorais HCT116, HepG2 e MCF-7 após exposição de 48 h ao composto ZM V. Os valores de viabilidade celular são referentes à média de três ensaios independentes e as barras de erros representam o erro padrão em relação à média.

De forma a avaliar a toxicidade do composto ZM V, procedeu-se ao estudo de viabilidade celular em linhas não-tumorais de fibroblastos e MCF-10A (epitélio mamário). Pela análise da Figura 3.2 observou-se uma diminuição gradual mas pouco acentuada da viabilidade celular. Para determinação dos valores de IC_{50} recorreu-se igualmente ao programa *GraphPad*, sendo estes 7,002 e 16,01 µM para fibroblastos e MCF-10A, respectivamente. Verifica-se então um aumento do IC_{50} nas linhas não-tumorais comparativamente às linhas tumorais comprovando que o composto em estudo mostra maior toxicidade em células tumorais.

Para a linha não-tumoral MCF-10A foram determinados por MTS valores de IC_{50} de 4,76 µM para a cisplatina (Ho *et al.*, 2007) e entre 20 a 25 µM para a DOX (Tapia *et al.*, 2007). Assim, quanto à citotoxicidade do ZM V, verifica-se que este composto é menos citotóxico do que a cisplatina, pois apresenta IC_{50} superior, mas mais citotóxico comparativamente à DOX.

Tendo em conta estes resultados pode-se afirmar que o ZM V é relativamente pouco tóxico em células não-tumorais, em comparação com outros agentes conhecidos e aplicados em quimioterapia. Verifica-se ainda que o composto em estudo apresenta maior toxicidade em células tumorais, sendo este o resultado pretendido para um composto com potencial anti-tumoral, aumentando assim o interesse no estudo do mecanismo de acção deste composto.

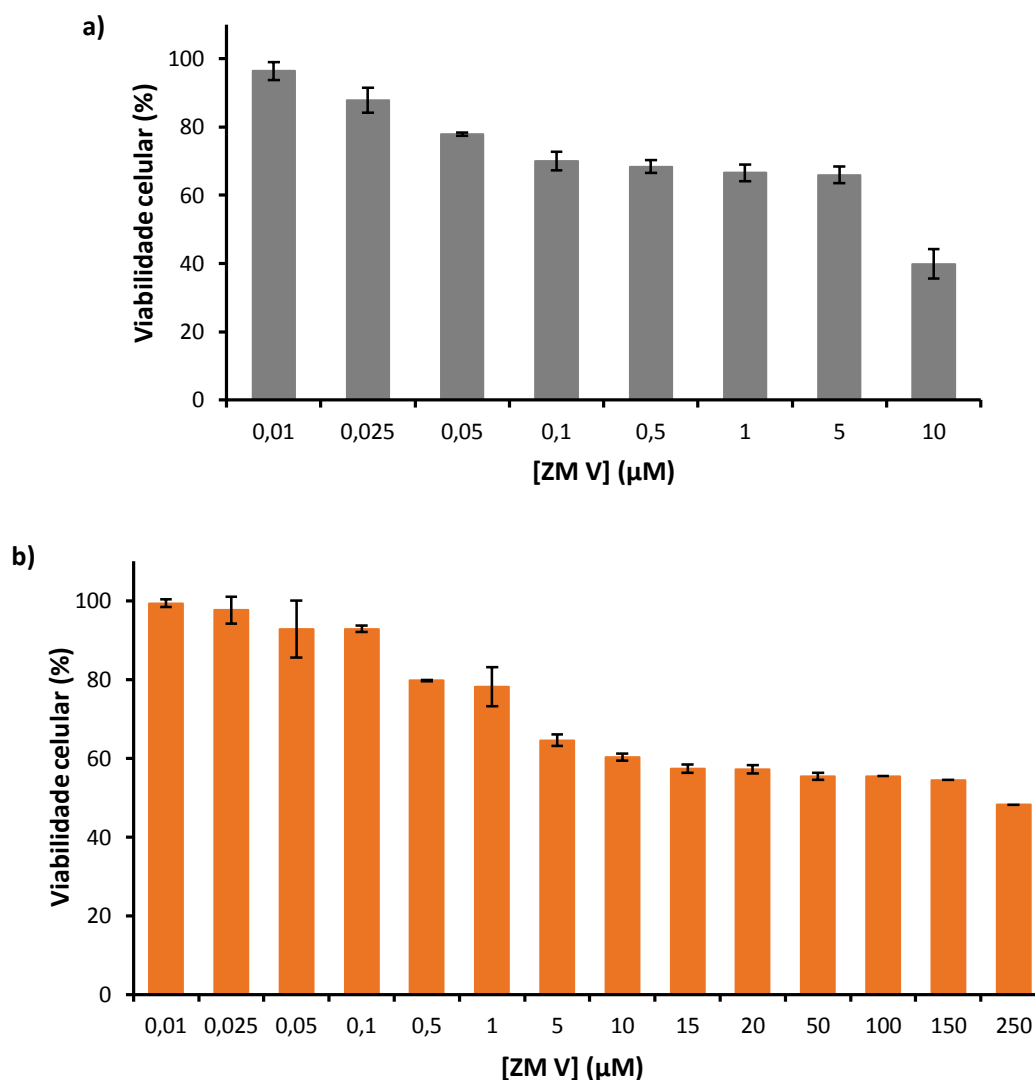


Figura 3.2 - Viabilidade celular das linhas não-tumorais de a) fibroblastos e b) MCF-10A após exposição de 48 h ao composto ZM V. Os valores de viabilidade celular são referentes à média de três ensaios independentes e as barras de erros representam o erro padrão em relação à média.

3.2. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL APOPTÓTICO

Parte dos agentes quimioterapêuticos conhecidos são capazes de induzir a morte de células tumorais induzindo o processo de apoptose, uma vez que provocam danos no DNA ou em proteínas celulares que excedem a capacidade dos mecanismos de reparação da célula (Wong, 2011; Herr, 2001).

Tendo em conta a perda de viabilidade celular apresentada pelas células tumorais quando expostas ao composto ZM V, foram realizados ensaios de marcação com Hoechst 33258 e de dupla marcação com Anexina V-FITC e IP, que permitem estudar o mecanismo de morte celular associado a este composto.

3.2.1. MARCAÇÃO COM A SONDA HOECHST 33258

A marcação com a sonda Hoechst 33258 constitui uma avaliação preliminar da capacidade do composto induzir apoptose. As células são permeáveis a esta sonda que apresenta afinidade para ácidos nucleicos, mais especificamente para o sulco menor do DNA. Quando se encontra ligada ao DNA apresenta fluorescência azul, marcando núcleos quer de células morfológicamente normais como de células apoptóticas (Hoechst Stains, MP21486, Invitrogen 2005; Cao *et al.*, 2011). Assim, é possível observar alterações nucleares como condensação da cromatina, fragmentação nuclear e formação de corpos apoptóticos que são características típicas da apoptose (Cao *et al.*, 2011; Kepp *et al.*, 2011). As células viáveis apresentam uma fluorescência uniformemente distribuída pelo núcleo, pois a cromatina não revela alterações e encontra-se distribuída por todo o núcleo. Por outro lado, células apoptóticas revelam condensação da cromatina que se traduz em núcleos mais pequenos e com maior fluorescência comparativamente com células normais (Yuan *et al.*, 2012; Cao *et al.*, 2011).

As células das linhas tumorais HCT116 e HepG2 foram expostas a diferentes concentrações de composto ZM V e marcadas com a sonda Hoechst 33258 (Figura 3.3 e 3.4). Pela análise das figuras obtidas verificou-se que as células expostas ao DMSO apresentam núcleos com fluorescência uniformemente distribuída e ainda células em mitose permitindo concluir que a utilização deste solvente nas concentrações testadas não induz apoptose nem paragem do ciclo celular. Quando tratadas com o composto ZM V, observa-se condensação da cromatina e fragmentação nuclear em algumas células. Com o aumento da concentração de ZM V verifica-se uma diminuição gradual do número total de células por preparação e, consequentemente, um aumento progressivo do número de células com as características apoptóticas já referidas. Assim, comprova-se a citotoxicidade do composto ZM V e a sua capacidade de induzir a apoptose em células tumorais.

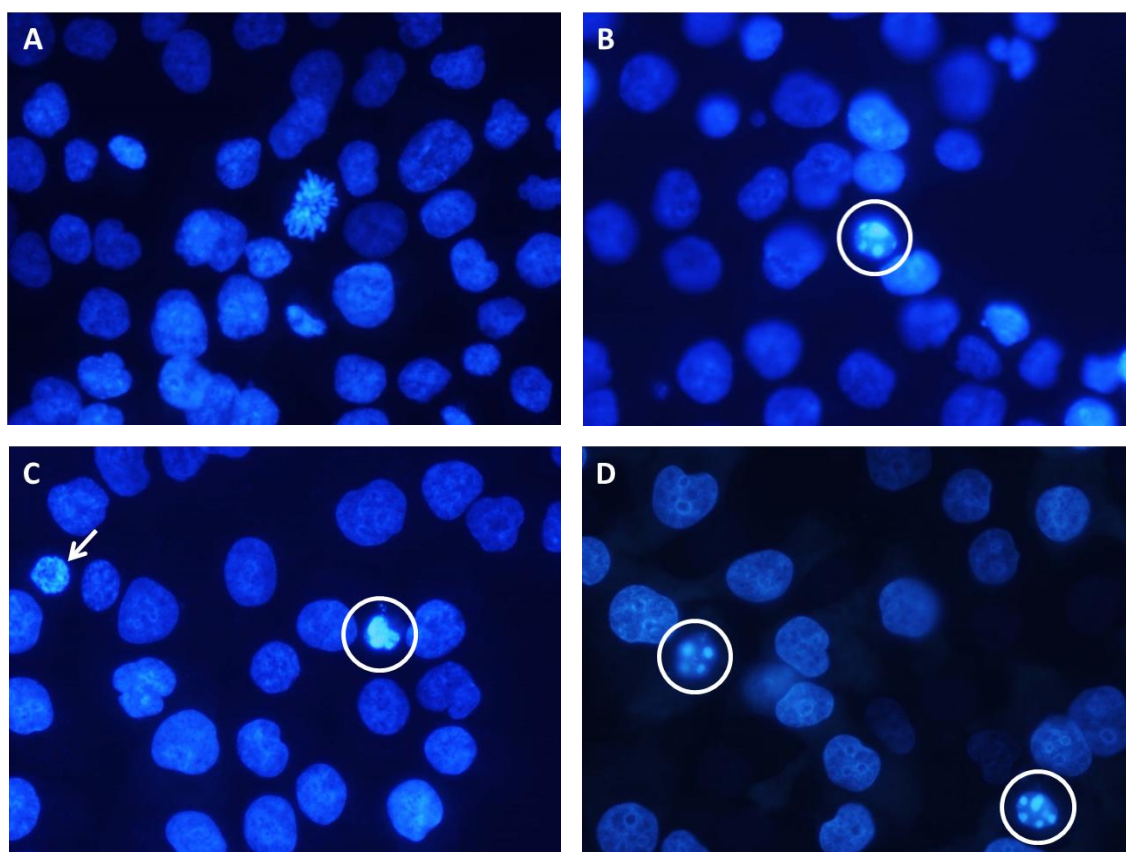


Figura 3.3 – Indução da apoptose pelo ZM V em células tumorais HCT116 após incubação de 24 h, posteriormente marcadas com a sonda Hoechst 33258 e visualizadas por microscopia de fluorescência. (A) Controle com DMSO; (B), (C) e (D) incubação com 0,025, 0,05 e 0,1 μ M de ZM V, respectivamente. Os círculos representam fragmentação nuclear e a seta condensação da cromatina. As imagens são exemplares de três ensaios independentes.

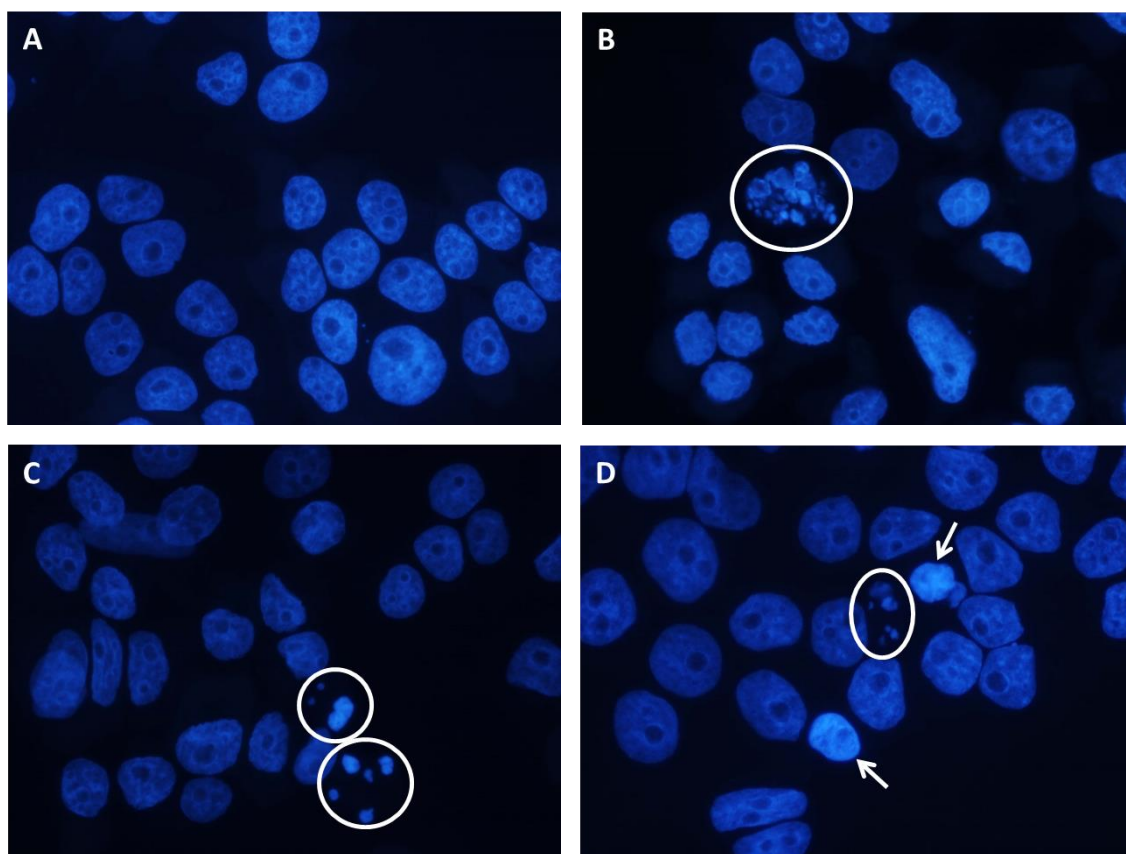


Figura 3.4 - Indução da apoptose pelo ZM V em células tumorais HepG2 após incubação de 24 h, marcadas com a sonda Hoechst 33258 e visualizadas por microscopia de fluorescência. (A) Controle com DMSO; (B), (C) e (D) incubação com 0,025, 0,05 e 0,1 μM de ZM V, respectivamente. Os círculos representam fragmentação nuclear e as setas condensação da cromatina. As imagens são exemplares de três ensaios independentes.

3.2.2. MARCAÇÃO COM ANEXINA V-FITC E IODETO DE PROPÍDIO

Demonstrou-se a capacidade do composto ZM V induzir a apoptose em células tumorais, pela marcação com Hoechst 33258. De modo a quantificar com maior rigor este mecanismo de morte celular realizou-se um ensaio com dupla marcação das células tumorais HCT116 com Anexina V-FITC e IP que foram posteriormente analisadas por citometria de fluxo.

A Anexina V pertence a uma família de proteínas que se ligam aos fosfolípidos de forma reversível e dependente de Ca^{2+} (Brumatti *et al.*, 2008). Esta proteína apresenta maior afinidade para a fosfatidilserina que se encontra no folheto interno da membrana celular e é externalizada como resposta ao aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} , danos celulares e agentes indutores de apoptose (Cao *et al.*, 2011; Brumatti *et al.*, 2008). Assim, a externalização da fosfatidilserina ocorre numa fase inicial da apoptose e antes da perda da integridade da membrana celular, sendo por isso uma evento típico da apoptose, cujo objectivo é permitir o reconhecimento das células apoptóticas pelos macrófagos (Carvalho *et al.*, 2012; Cao *et al.*, 2011; Brumatti *et al.*, 2008; Ho *et al.*, 2007). O FITC (do inglês, *fluorescein*

isothiocyanate) é um fluoróforo que se conjuga com a Anexina V para detectar células apoptóticas através da emissão de fluorescência (Brumatti *et al.*, 2008). O IP é um fluoróforo que se liga a ácidos nucleicos de células com a membrana celular comprometida, marcando desta forma células em apoptose tardia e células necróticas (Ho *et al.*, 2007; Riccardi e Nicoletti, 2006).

A utilização da dupla marcação com Anexina V-FITC e IP para detecção de células apoptóticas por citometria de fluxo permite distinguir entre células em apoptose inicial e células em apoptose tardia e, ainda, células apoptóticas de células necróticas (Brumatti *et al.*, 2008). As células viáveis apresentam-se negativas para ambas as marcações (Anexina V⁻/IP⁻) (Cao *et al.*, 2011; Ho *et al.*, 2007). Células que se encontrem numa fase inicial da apoptose são positivas para a marcação com Anexina V e negativas para o IP (Anexina V⁺/IP⁻), pois este não consegue entrar nas células por terem a membrana celular intacta (Yu *et al.*, 2013; Brumatti *et al.*, 2008). Numa fase tardia da apoptose, o IP entra nas células que vão apresentar dupla marcação (Anexina V⁺/IP⁺) (Brumatti *et al.*, 2008; Ho *et al.*, 2007). As células necróticas são marcadas com IP (Anexina V⁻/IP⁺) (Yu *et al.*, 2013; Carvalho *et al.*, 2012).

Os resultados obtidos encontram-se representados na Figura 3.5 e na Tabela 3.1. Na amostra controlo verifica-se que a maioria das células (75,91 %) se apresenta sem marcação (Anexina V⁻/IP⁻) correspondendo às células viáveis. No caso das amostras tratadas com o composto ZM V é observada uma diminuição considerável de células viáveis relativamente ao controlo, passando para 35,85 e 24,94 % para as concentrações de 0,05 e 0,1 µM, respectivamente, o que representa uma diminuição em mais de 50 %. Por outro lado, o número de células em apoptose inicial aumentou na presença do composto, passando de 2,63 % (controlo) para 13,42 % (com 0,05 µM de ZM V) e 18,72 % (com 0,1 µM de ZM V). Verificou-se igualmente um aumento da apoptose tardia que passou de 17,74 % no controlo para 46,27 % na concentração de 0,05 µM e 52,22 % na concentração de 0,1 µM de ZM V. Comparando os resultados obtidos para as amostras tratadas com o composto observa-se que, com o aumento da concentração, o número de células viáveis diminui em detrimento do aumento de células apoptóticas totais, encontrando-se as células maioritariamente em apoptose tardia. No que diz respeito a células necróticas não se observa variações significativas entre o controlo e as amostras expostas ao composto (3,72 % no controlo, 4,46 % para 0,05 µM de ZM V e 4,12 para 0,1 µM de ZM V).

Estes resultados corroboram as observações feitas pela marcação com a sonda Hoechst 33258, que indicava a indução de apoptose por parte do composto ZM V. Aliado com a diminuição de viabilidade celular evidenciada pelo ensaio MTS e tendo em conta que este ensaio de dupla marcação com Anexina V-FITC e IP revelou um aumento considerável de apoptose comparativamente ao controlo pressupõe-se que o principal mecanismo de acção deste composto seja a indução de apoptose.

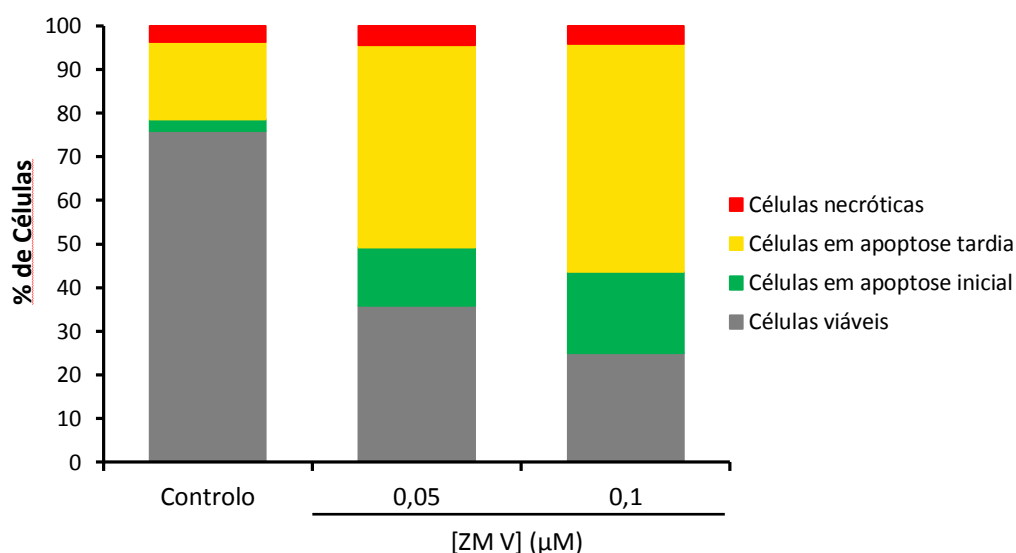


Figura 3.5 – Ensaio de citometria de fluxo com dupla marcação com Anexina V-FITC e IP para células tumorais HCT116 incubadas durante 48 h com 0,1 % (v/v) de DMSO (Controlo) ou com ZM V nas concentrações de 0,05 e 0,1 μM. O tratamento dos resultados foi realizado no *Attune® Cytometric software*. Os valores são referentes à média de três ensaios independentes.

Tabela 3.1 – Percentagem de células viáveis, células apoptóticas iniciais e tardias e células necróticas após incubação de células HCT116 com 0,1 % (v/v) de DMSO (Controlo) ou com 0,05 e 0,1 μM de ZM V. Os valores são referentes aos dados apresentados na Figura 3.5, correspondendo à média de três ensaios independentes com respectivos erros padrão.

	Controlo	[ZM V] (μM)	
		0,05	0,1
Células viáveis	75,91 (± 4,27)	35,85 (± 7,63)	24,94 (± 4,48)
Células em apoptose inicial	2,63 (± 0,28)	13,42 (± 3,38)	18,72 (± 7,66)
Células em apoptose tardia	17,74 (± 5,00)	46,27 (± 10,66)	52,22 (± 3,54)
Células necróticas	3,72 (± 0,46)	4,46 (± 0,30)	4,12 (± 0,60)

3.3. ESTUDO DA EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA APOPTOSE

Com o objectivo de melhor compreender a capacidade do composto ZM V em induzir a apoptose procedeu-se ao estudo da expressão de alguns genes envolvidos no processo apoptótico, sendo eles *BAX*, *BCL-2* e *CASP3* que codificam para as proteínas Bax, Bcl-2 e caspase 3, respectivamente. Após a exposição das células HCT116 a 0,1 % (v/v) de DMSO ou 0,05 μM de ZM V durante 3, 6, 9 e 12 h realizou-se a extracção de RNA e a síntese de cDNA, que foi utilizado como molde para detecção de expressão dos genes em estudo. Procedeu-se então à amplificação dos genes por PCR, obtendo-se como resultado valores de Ct que foram tratados e normalizados com uma referência interna (o gene *rRNA18S5* que codifica para o

RNA ribossomal 18S) e com um controlo não tratado (DMSO) (Alshatwi, 2010; Livak e Schmittgen, 2001) (Figura 3.6).

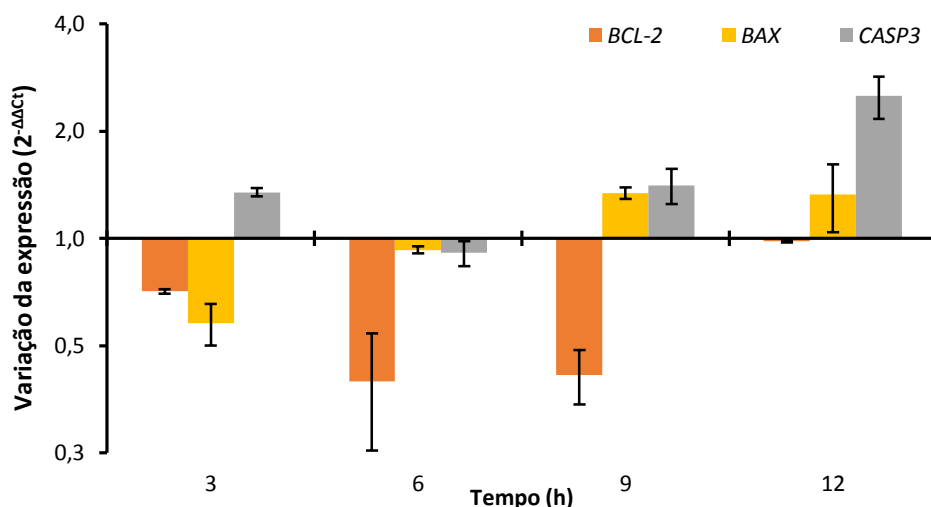


Figura 3.6 – Níveis de expressão de genes apoptóticos *BCL-2*, *BAX*, *CASP3* em células HCT116 incubadas com 0,1 % (v/v) de DMSO (controlo) ou 0,05 μ M de ZM V durante 3, 6, 9 e 12 h. A variação da expressão dos genes é calculada através de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, sendo os dados apresentados como alterações na expressão dos genes normalizada com uma referência interna (gene *rRNA18S5*) e com um controlo não tratado (DMSO). Valores de expressão superiores a 1 são considerados sobre-expressão e valores inferiores são sub-expressão.

A via intrínseca da apoptose é regulada pela família de proteínas Bcl-2 que é composta por dois grupos: proteínas pró-apoptóticas, da qual se destaca a Bax, e proteínas anti-apoptóticas, como a Bcl-2 (Elmore, 2007). Estas proteínas regulam o processo apoptótico: as anti-apoptóticas bloqueiam a libertação de citocromo c enquanto as pró-apoptóticas estimulam a sua libertação (Ghobrial *et al.*, 2005). A ocorrência de apoptose é um processo que se encontra mais dependente da razão entre Bax e Bcl-2 do que apenas dos níveis de expressão da Bcl-2 (Ghobrial *et al.*, 2005). Desta forma, verifica-se que os níveis de expressão do gene *BCL-2* são sempre inferiores ao controlo ao longo das 12 h. Para o gene *BAX* observa-se um aumento constante da sua expressão, mas entre as 9 e as 12 h esse valor mantém-se constante. Relativamente à razão *BAX/BCL-2* obteve-se para as 3 h um valor de 0,81, que demonstra que a expressão de *BCL-2* é ligeiramente superior à de *BAX*, supondo-se então que o processo apoptótico ainda não foi iniciado. Com incubação de 6 h verifica-se um aumento da expressão de *BAX* e uma diminuição de *BCL-2*, que se traduz num aumento da razão para 2,34, podendo-se então supor que, neste ponto, células mais susceptíveis ao composto tenham já iniciado a cascata apoptótica. Às 9 h observa-se o máximo de expressão para a *BAX* e um aumento da razão para 3,24 indicativo da existência de maior número de células em apoptose. Nas 12 h de exposição ao composto verifica-se uma diminuição da razão para 1,35 devido à estabilização na expressão de *BAX* e ao aumento de *BCL-2*, sugerindo um decaimento da iniciação da apoptose, propondo a progressão do processo apoptótico ao nível, por exemplo, da activação das caspases efectoras.

O gene *CASP3* codifica para a caspase 3, uma caspase efectora responsável pela clivagem de diversos componentes celulares levando, por fim, às alterações morfológicas típicas da apoptose (Wong, 2011; Elmore, 2007). Esta caspase é activada pela caspase 8, no caso da via extrínseca, ou pela caspase 9, na via intrínseca (Wong, 2011; Kaufmann e Earnshaw, 2000). A caspase 3 apenas é necessária numa fase mais avançada da cascata apoptótica pelo que a sua activação se encontra dependente do aumento da razão *BAX/BCL-2*. Assim, entre as 6 e as 12 h a expressão de *CASP3* aumenta consideravelmente, com o objectivo de síntese de maiores níveis de proteína, sendo esta necessária para execução do processo apoptótico, como por exemplo clivagem de proteínas do citoesqueleto e de reparação do DNA e activação de DNases para degradação do DNA (Wong, 2011; Elmore, 2007).

Em conjunto os resultados obtidos dão indicação de que o processo apoptótico é iniciado após 6 h de incubação com o composto ZM V (maior expressão de *BAX* relativamente ao *BCL-2*) registando-se um seguimento do processo de apoptose às 12 h (aumento de *BCL-2* e estabilização de *BAX*), período no qual a apoptose se encontra maioritariamente numa fase de execução das alterações celulares (elevada expressão de *CASP3*). Comprova-se assim que a acção do composto ZM V desencadeia a apoptose, tal como verificado nos ensaios de avaliação do potencial apoptótico, uma vez que leva ao aumento da expressão de genes responsáveis pelas alterações bioquímicas e morfológicas características deste mecanismo de morte celular.

3.4. PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR

O ciclo celular é dividido em quatro fases principais: na fase G1 ocorre o crescimento celular, a síntese de RNA e de proteínas e os cromossomas são preparados para replicação; a fase S consiste na replicação do DNA nuclear; a fase G2 é uma preparação para a mitose que consiste na divisão celular dando origem a duas células idênticas. Na fase G0, a célula sai do ciclo celular de forma temporária ou permanente (Alberts *et al.*, 2004; Lodish *et al.*, 2004; Sandal, 2002).

Neste ensaio, as células HCT116 são sujeitas a um duplo bloqueio com timidina, que sincroniza as células na fase G1/S, sendo depois incubadas com 0,05 μ M de ZM V ou 0,1 % (v/v) de DMSO em meio de cultura livre de timidina, o que permite a continuação do ciclo celular (Borralho *et al.*, 2009; Garrett, 2001). Desta forma quaisquer diferenças entre as amostras controlo e as amostras expostas ao ZM V, tais como paragem ou retardamento do ciclo celular, são devido à acção do composto. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo e os resultados obtidos foram tratados no *Attune® Cytometric software*. Os histogramas resultantes estão representados na Figura 3.7 e a sua análise gráfica na Figura 3.8.

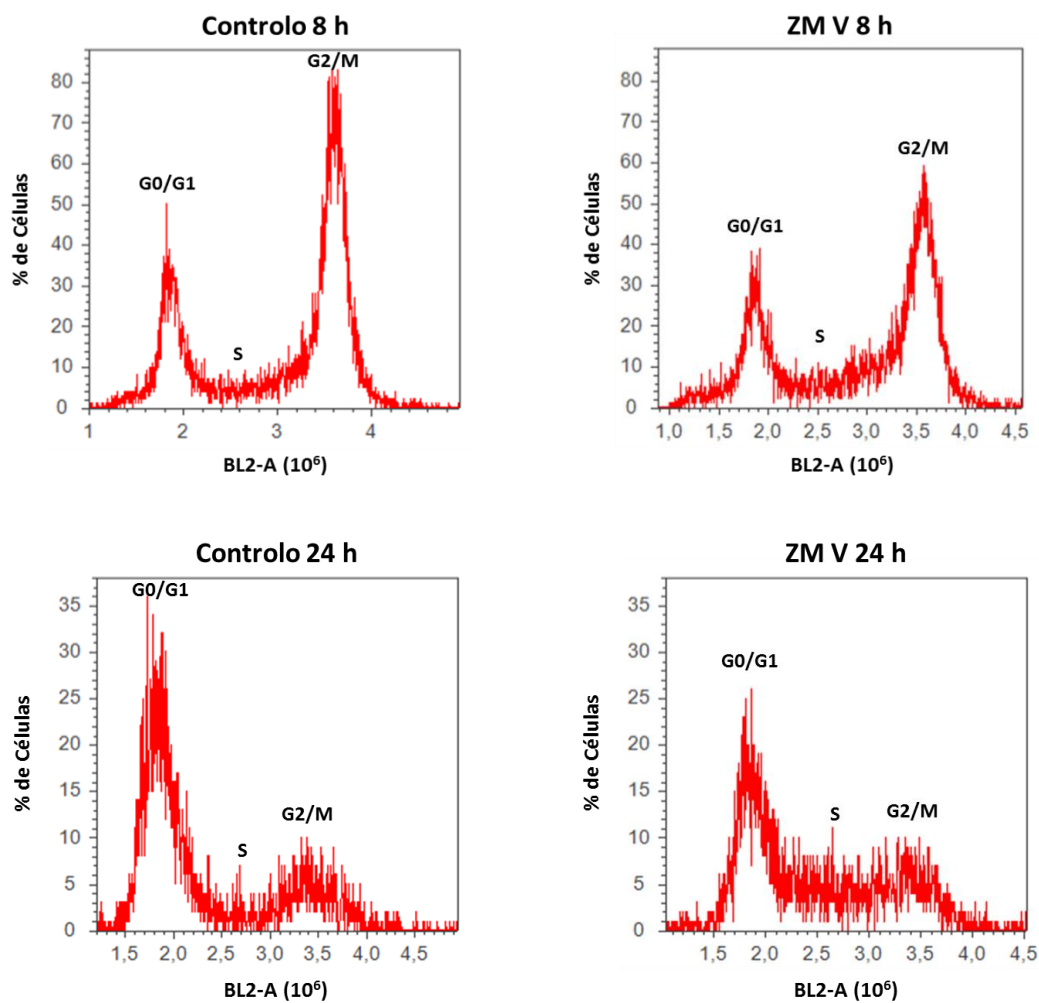


Figura 3.7 – Distribuição das células pelas diversas fases do ciclo celular. Células HCT116 foram sujeitas a duplo bloqueio com 2 mM de timidina e, posteriormente, expostas a 0,1 % (v/v) de DMSO (controlo) ou 0,05 μ M de ZM V durante 8 e 24 h. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo e os resultados foram tratados no *Attune® Cytometric software*. Os histogramas são representativos de três ensaios independentes.

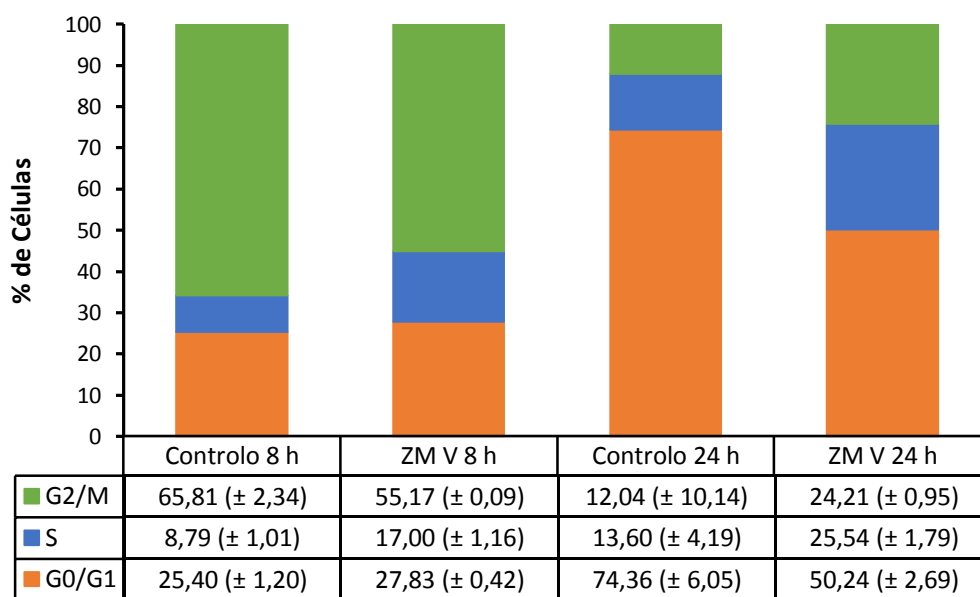


Figura 3.8 – Representação gráfica da percentagem de células HCT116 presente em cada fase do ciclo celular, após incubações de 8 e 24 h com 0,1 % (v/v) de DMSO (amostra controlo) ou 0,05 μ M de ZM V. As células foram previamente submetidas a um duplo bloqueio com timidina e analisadas por citometria de fluxo. Os resultados correspondem à média de três ensaios independentes com respectivos erros padrão.

Verifica-se que a amostra controlo correspondente às 8 h de incubação apresenta a maioria das células (65,81 %) na fase G2/M, sendo que algumas ainda se encontram na fase G0/G1 (25,40 %). No controlo das 24 h pode-se observar a progressão do ciclo celular sendo que 74,36 % das células se encontra na fase G0/G1, 13,60 % na fase S, que corresponde a um valor superior quando comparado ao controlo das 8 h, e 12,04 % na fase G2/M. Células incubadas durante 8 h na presença de composto ZM V revelam resultados semelhantes ao controlo das 8 h, sendo que 55,17 % das células estão na fase G2/M, 17,00 % na fase S e 27,83 % na fase G0/G1. Contudo é possível observar algumas diferenças no modo como o ciclo celular progride na ausência e presença de composto. Enquanto a maioria das células controlo completa a replicação do DNA em aproximadamente 8 h, as células expostas ao composto aparentam estar um pouco mais atrasadas pois verifica-se que o número de células em S é cerca do dobro e que existem menos células na fase G2/M. Desta forma é possível notar um certo atraso na progressão do ciclo, provavelmente na progressão de G1 ou na transição para fase S.

No caso das células expostas ao ZM V durante 24 h verifica-se a progressão do ciclo celular relativamente à exposição de 8 h, mas de uma forma mais lenta comparativamente às células não expostas ao composto. As células passaram da fase G2/M para a G0/G1, sendo que 50,24 % se encontram nesta fase. As restantes etapas do ciclo também demonstram alterações apresentando 25,54 e 24,21 % das células nas fases S e G2/M, respectivamente. Tal como aconteceu na incubação de 8 h com ZM V parece haver um ligeiro atraso do ciclo celular. A percentagem de células na fase G0/G1 é muito inferior ao controlo das 24 h e as células em G2/M é muito superior sendo que, mais uma vez, as células que se encontram na fase S são

cerca do dobro relativamente ao controlo, indicando que esta etapa não progrediu tão rapidamente.

Comparando os valores percentuais das diferentes fases do ciclo celular do controlo das 8 h com o controlo das 24 h verifica-se que as células que se encontravam em S e G2/M progrediram para G0/G1 e que as que estavam em G0/G1 passaram para S e G2/M. Aplicando o mesmo raciocínio para as células expostas ao ZM V durante 8 e 24 h verifica-se que esta transição entre fases não é tão linear. Desta forma, observa-se que a maioria das células que se encontravam em G2/M às 8 h transitaram para G0/G1, as da fase S passaram para G2/M e as que estavam em G0/G1 se encontram maioritariamente em S às 24 h. Pressupõe-se então que o composto tenha algum efeito no ciclo celular, provocando um ligeiro atraso na progressão do mesmo. Pelo que foi observado, é possível que o atraso ocorra na transição da fase G1 para a fase S, sendo este o ponto de controlo mais importante e regulado do ciclo celular (Sandal, 2002). Uma forma de comprovar este efeito seria realizar o estudo da expressão de genes envolvidos na regulação do ciclo celular através de RT-PCR, especificamente proteínas responsáveis pela paragem do ciclo celular, como a p21, e pela progressão da fase G1 e transição para a fase S, como por exemplo as ciclinas D1, D2, D3 e E2 e as cdk2, 4 e 6.

3.5. ESTUDOS DE INTERACÇÃO COM O DNA

3.5.1. ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO

Muitos agentes quimioterapêuticos têm como alvo o DNA e, uma vez que, complexos metálicos interagem com o DNA estes são muito utilizados como agentes terapêuticos (Macías *et al.*, 2007; Tabassum e Pettinari, 2006). Alguns complexos de cobre apresentam capacidade de ligação ao DNA, por vezes devido aos ligandos que intercalam com o mesmo, potenciando assim a clivagem oxidativa, que ocorre pela produção de ROS, ou a clivagem hidrolítica do DNA (Iakovidis *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2009; Marzano *et al.*, 2009; Rajendiran *et al.*, 2007).

Desta forma, procedeu-se ao estudo de interacção entre o composto ZM V e o CT-DNA para determinar os possíveis modos de ligação ao CT-DNA e ainda calcular a constante de ligação ao DNA (K_b). O espectro UV foi traçado usando uma concentração constante de composto na ausência ou presença de diferentes concentrações de CT-DNA. A força de ligação do composto ao CT-DNA foi calculada através do K_b , obtido pelas alterações observadas no comprimento de onda para o qual se verifica o máximo de absorvância do composto (Dimiza *et al.*, 2011).

As interacções entre o DNA e um complexo metálico incluem a intercalação, ligações electrostáticas e ligações aos sulcos, frequentemente por parte de complexos metálicos catiónicos que se ligam na parte exterior da hélice do DNA ou aos sulcos maior ou menor (Afrati *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2009a; Mudasir *et al.*, 1999). Quando ligadas ao DNA, as moléculas são estabilizadas por interacções entre os cromóforos aromáticos do composto e as

bases do DNA (intercalação), por ligações de hidrogénio e por interações de van der Waals dos grupos funcionais ligados aos sulcos da hélice do DNA (Liu *et al.*, 2009b; Xu *et al.*, 2008; Mudasir *et al.*, 1999). Geralmente, quando espectros de absorção apresentam um extenso efeito hipocrómico e um efeito batocrómico significativo então a interacção entre o composto e o DNA pode ocorrer através de intercalação (Liu *et al.*, 2009b; Dimitrakopoulou *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2001b). A ausência de batocromismo indica que não ocorre a intercalação do composto com o DNA sugerindo por sua vez a interacção com os sulcos do DNA (Ramakrishnan *et al.*, 2011; Kashanian *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2008).

A análise da Figura 3.9 revela que o composto ZM V tem capacidade de interagir com o DNA provocando, desta forma, o efeito hipocrómico observável pela diminuição do valor máximo de absorvância. Não se verifica, no entanto, qualquer efeito batocrómico o que poderá ser indicativo de que a interacção entre o ZM V e o DNA não ocorre por intercalação. O hipocromismo observado e a ausência de batocromismo podem ser indicativos da ligação do composto ao sulco do DNA, que leva a pequenas variações no espectro de absorvância. O hipocromismo pode resultar do contacto externo do ZM V com a dupla cadeia de DNA (Kashanian *et al.*, 2010).

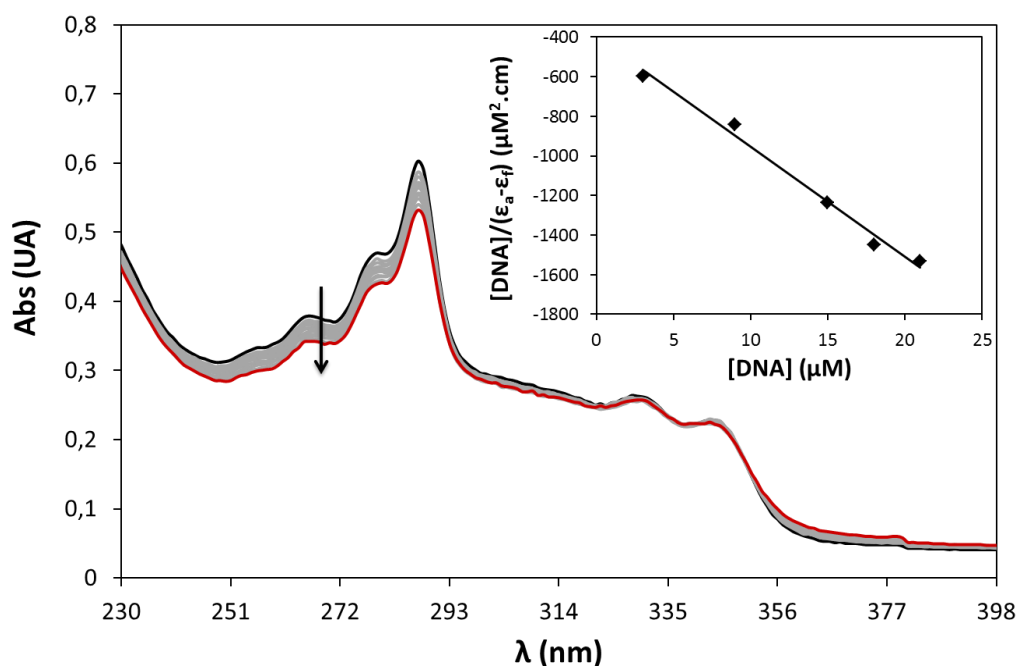


Figura 3.9 – Variação da absorvância do composto ZM V na ausência (linha a preto) e na presença de concentrações crescentes de CT-DNA (0 a 27 μM) (linhas a cinza, estando a maior concentração de DNA representada pela linha vermelha). Os espectros foram traçados em tampão 5 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 7,02. A seta indica a variação da absorvância com o aumento da concentração de CT-DNA. No canto superior direito encontra-se representada a regressão linear a partir da qual se determinou o valor da constante de afinidade para o DNA (K_b).

Para determinar a força de ligação ao DNA foi então calculado o K_b para o composto ZM V, obtendo-se o valor de $1,39 (\pm 0,03) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. Quando comparado com o valor de K_b para a DOX ($3,48 (\pm 0,04) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) (Luís, 2011) verifica-se que ambos os compostos se encontram na mesma ordem de grandeza, mas o valor absoluto para o ZM V é inferior, o que indica que este composto tem uma capacidade de ligação ao DNA menor do que a DOX.

3.5.2. ESTUDOS DE CLIVAGEM DE DNA PLASMÍDICO

Através do ensaio de espectroscopia de absorção verificou-se a existência de interacção entre o composto ZM V e o DNA, mas muitos complexos de cobre ligam-se ao DNA para posterior clivagem do mesmo (Iakovidis *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2009; Rajendiran *et al.*, 2007). Desta forma procedeu-se ao ensaio de clivagem de DNA plasmídico (pDNA) em que este foi incubado, durante 24 h, na presença de concentrações crescentes do composto ZM V e, posteriormente, sujeito a electroforese em gel de agarose.

O pDNA apresenta-se numa conformação circular compacta, a forma superenrolada (forma I). Caso seja clivada em cadeia simples adopta uma conformação relaxada, a forma circular (forma II), que pode ser convertida em DNA linear após a clivagem da cadeia complementar perto do primeiro local de corte. Outra forma de converter a forma superenrolada na forma linear (forma III) é através de clivagem em cadeia dupla (Silva *et al.*, 2011; Rey *et al.*, 2009).

Por análise dos resultados obtidos na Figura 3.10 verifica-se no controlo incubado com DMSO as três bandas correspondentes às diferentes formas do pDNA, sendo a forma I a que apresenta maior intensidade. Comparativamente com a amostra incubada com $5 \mu\text{M}$ de ZM V não são observáveis diferenças significativas na distribuição das três conformações. No entanto, o aumento da concentração de ZM V traduz-se numa diminuição constante da intensidade das bandas correspondentes às formas I e II e num aumento da forma III. Para uma concentração de composto de $100 \mu\text{M}$ verifica-se uma quantidade aproximadamente igual de forma I e de forma III, sendo que a forma II foi totalmente convertida na forma III. Estas variações na distribuição das formas do pDNA devem-se a quebras ocorridas nas cadeias de DNA induzidas pelo composto ZM V, comprovando assim a sua capacidade de clivagem do DNA.

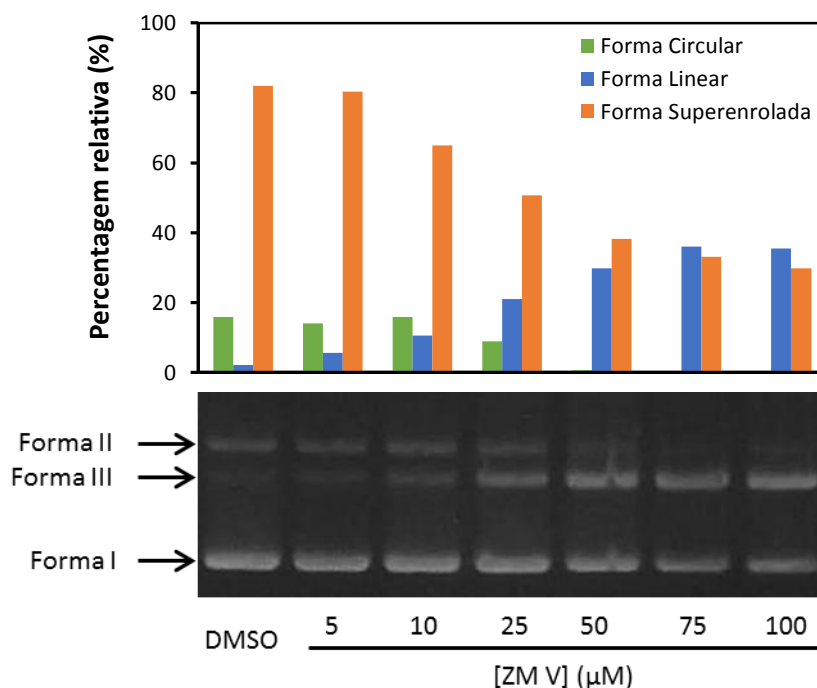


Figura 3.10 – Efeito da incubação de 200 ng de DNA plasmídico pBSK II com DMSO (amostra controlo) e com diferentes concentrações de composto ZM V (5, 10, 25, 50, 75 e 100 μM). A incubação decorreu durante 24 h a 37 °C em tampão 5 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 7,2, sendo posteriormente os seus produtos sujeitos a electroforese em gel de agarose a 0,7 % (p/v) e o gel foi corado com brometo de etídio. O gráfico de barras indica a distribuição das conformações do pDNA, em percentagem, obtida através do *software GelAnalyzer*. DMSO – pBSK II incubado com 9,5 % (v/v) de DMSO. Forma I – forma superenrolada; forma II – forma circular; forma III – forma linear.

3.5.3. EMSA DE PDNA DEPENDENTE DO TEMPO

Com o ensaio anterior verificou-se a ocorrência de clivagem da dupla cadeia do pDNA, mas pretende-se observar o efeito nas isoformas do pDNA após incubação ao longo do tempo na presença do composto ZM V. Para tal, seleccionaram-se duas concentrações de composto (10 e 50 μM) que foram incubadas com pDNA por diferentes períodos de tempo (1, 5, 20, 24 e 48 h) de forma a visualizar a transição entre as diferentes conformações do pDNA.

Para a concentração de 10 μM de ZM V (Figura 3.11) verificou-se, a partir das 20 h de incubação, uma ligeira diminuição da forma I, sendo a percentagem de perda dessa forma correspondente à percentagem de ganho da forma III. Apesar de se observar algumas variações na forma II estas não se revelam significativas e, como tal, praticamente não contribuem para o aumento da forma III. Desta forma, pode-se afirmar que a forma I é convertida directamente na forma III sem passar pela forma II.

Nas amostras incubadas com 50 μM de ZM V foi observado um efeito semelhante ao acima descrito (Figura 3.11). Neste caso verificou-se alterações na distribuição das conformações do pDNA logo a partir da primeira hora de incubação. A forma I apresenta uma

diminuição mais acentuada e, conseqüentemente, a forma III demonstra um aumento mais intenso. A forma II revela uma diminuição constante, sendo que às 24 h essa forma se encontra extinta, provavelmente devido à sua conversão na forma III. O aumento da forma III parece englobar o decaimento das outras duas formas, podendo-se afirmar que ambas são convertidas nesta conformação. Tal como aconteceu para a concentração inferior, não se verifica um aumento da forma II confirmando assim que a forma I é convertida directamente na forma III. Caso ocorressem quebras em cadeia simples, a forma I seria primeiro convertida na forma II e posteriormente na forma III. O mecanismo de acção apresentado pelo composto ZM V é então típico para casos em que ocorre clivagem em cadeia dupla, no qual o segundo corte que origina a forma III é feito na cadeia complementar a menos de 16 nucleótidos de distância do primeiro (Branum *et al.*, 2001).

Os complexos de cobre podem induzir quebras no DNA através de dois mecanismos: a clivagem hidrolítica ou a clivagem oxidativa (Li *et al.*, 2009). Os ensaios realizados de interacção com o DNA não permitem determinar o tipo de processo associado à indução de quebras no DNA por parte do composto ZM V. Desta forma, a realização do ensaio de *scavengers* poderia fornecer mais informações acerca do mecanismo de acção deste composto. Assim, o pBSK II seria, por exemplo, incubado com agentes indutores de ROS (H_2O_2), agentes redutores (NaN_3) e com um agente quelante (EDTA), seguindo-se a recuperação da forma III e incubação com a enzima T4 ligase (Rajendiran *et al.*, 2007). No caso de ocorrer a religação dos fragmentos de DNA então o mecanismo de quebra envolvido seria provavelmente o hidrolítico, enquanto que a não religação do DNA indicaria um processo oxidativo (Li *et al.*, 2009).

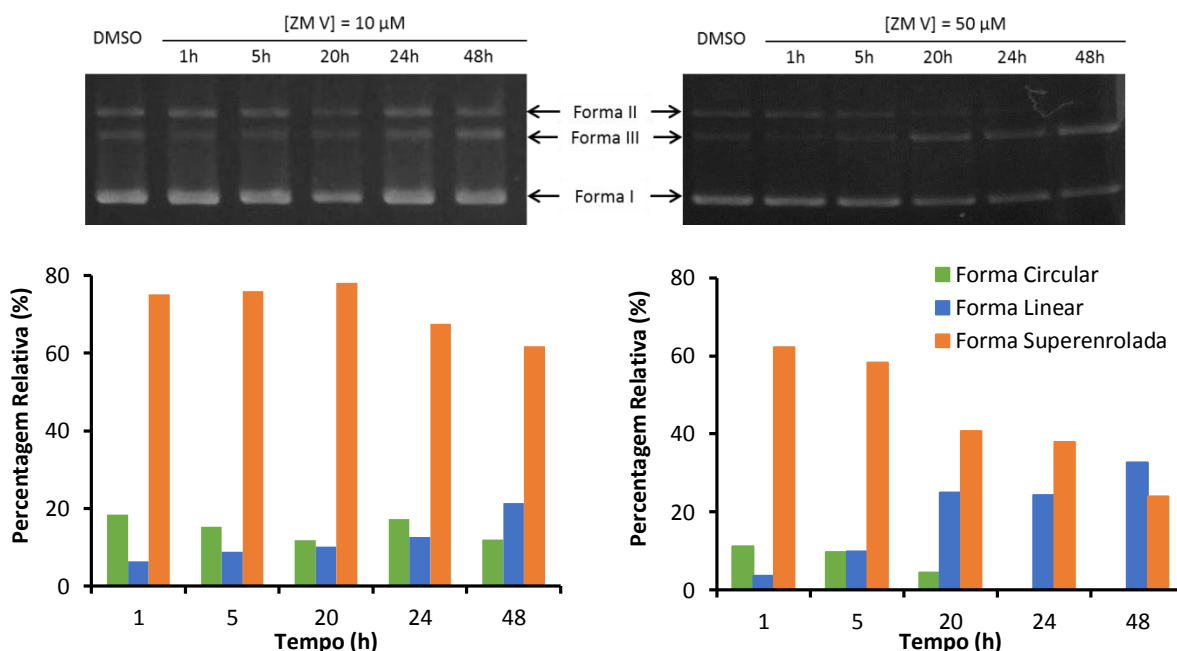


Figura 3.11 – Efeito da incubação de pBSK II com 10 e 50 μM de ZM V durante diferentes períodos de tempo (1, 5, 20, 24 e 48 h) a 37 °C em tampão 5 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 7,2. Os gráficos representam a distribuição das conformações do pDNA, em percentagem, ao longo do tempo; os valores foram obtidos através do *software GelAnalyzer*. O gráfico do lado esquerdo é referente à incubação com 10 μM de ZM V e o do lado direito à incubação com 50 μM de ZM V. Forma I – forma superenrolada; forma II – forma circular; forma III – forma linear.

3.6. ELECTROFORESE EM GEL DE CÉLULA ÚNICA OU ENSAIO *COMET*

Os resultados dos ensaios de interacção com o DNA revelaram a ocorrência de quebras em cadeia dupla, mas nestes casos apenas se estuda o efeito entre o composto e o DNA livre, que se encontra mais acessível e com menos variáveis que influenciem a acção do composto. Desta forma, realizou-se o ensaio *comet* de forma a estudar a capacidade do composto em introduzir quebras no DNA de células tumorais HCT116.

Neste ensaio, as células são combinadas com agarose, lisadas de forma a remover o conteúdo celular com excepção do material nuclear e, por fim, submetidas a electroforese que provoca a migração do DNA a partir do núcleo formando um “cometa” cuja cabeça é constituída por DNA intacto e uma cauda composta por fragmentos de DNA de menores dimensões (Liao *et al.*, 2009; Olive e Banáth, 2006; Rojas *et al.*, 1999). A distância de migração do DNA a partir do núcleo e a quantidade de DNA presente na cauda do cometa são usadas para avaliar a extensão dos danos provocados e das quebras induzidas pelo composto (Kumaravel *et al.*, 2009; Olive e Banáth, 2006; Fairbairn *et al.*, 1995).

Após a análise das imagens no programa *CometScore* foi possível atribuir a cada cometa um valor, em percentagem, do DNA presente na cauda do cometa sendo depois esses resultados agrupados em intervalos que correspondem a cinco classes (de 0 a 4) (Figura 3.12).

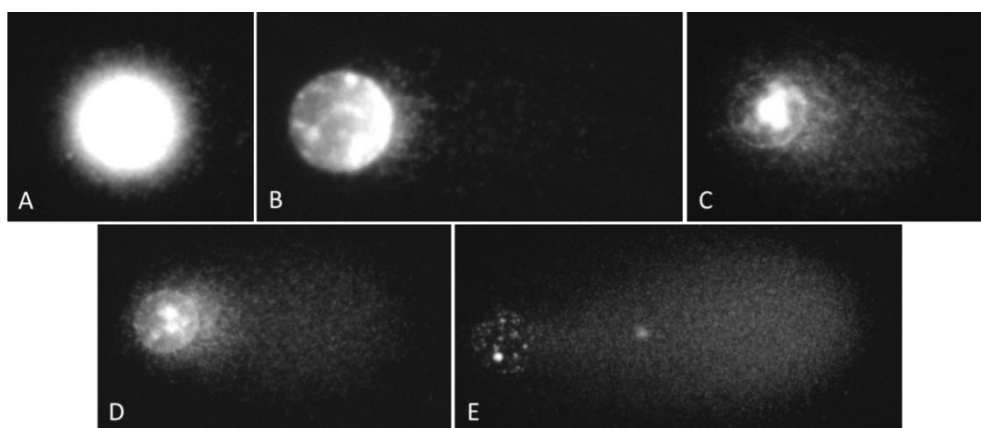


Figura 3.12 – Distinção visual entre cometas com diferentes níveis de danos. A percentagem de DNA na cauda é calculada através do programa *CometScore* e depois agrupada por intervalos: [0-20[, [20-40[, [40-60[, [60-80[e [80-100[que correspondem às classes 0, 1, 2, 3 e 4, respectivamente. A – classe 0; B – classe 1; C – classe 2; D – classe 3; E – classe 4. As imagens são representativas dos níveis de danos obtidos no ensaio realizado.

Os resultados obtidos para as condições testadas encontram-se representados na Figura 3.13. As amostras correspondentes ao controlo negativo, ou seja, células incubadas na ausência de composto ZM V, DMSO ou H₂O₂, apresentam a maioria das células nas classes 0 (46,6 %) e 1 (43,4 %) verificando-se a presença de poucos danos.

Células incubadas com DMSO apresentam danos de todas as classes mas maioritariamente na classe 0 (45,9 % das células) seguindo-se um decréscimo do número de

células presentes em cada classe em função do aumento da extensão das quebras provocadas. Comparativamente ao controlo negativo, estas células revelam danos um pouco mais severos.

A exposição das células ao composto ZM V numa concentração de 0,1 μM revela que a maioria das células (39,4 %) apresenta danos de classe 1 embora também se encontre um grande número na classe 0, correspondendo a 35,1 % das células. As restantes classes demonstram uma maior quantidade de células em comparação com o controlo negativo e com o DMSO, sendo de 18,2; 6,2 e 1,2 para as classes 2, 3 e 4, respectivamente. Estes resultados comprovam que o composto ZM V é capaz de provocar quebras no DNA, tal como esperado após os ensaios de interacção com o pDNA.

O H_2O_2 é um forte indutor de quebras no DNA por via da formação de ROS o que se traduz em danos mais severos e, como tal, numa maior percentagem de DNA na cauda dos cometas. Assim, as amostras incubadas com 0,05 % de H_2O_2 apresentam a maioria das células (33,4 %) com danos de classe 1, mas as classes 2, 3 e 4 também revelam uma grande percentagem de células (27,5; 14,9 e 6 %) comparativamente com o controlo negativo e com o DMSO, demonstrando que o H_2O_2 provoca uma maior extensão dos danos. O composto ZM V apresenta um perfil de distribuição de danos semelhante ao H_2O_2 , mas revela maior número de células nas classes inferiores (0 e 1) e menor número nas classes superiores (2, 3 e 4) comparativamente com o H_2O_2 .

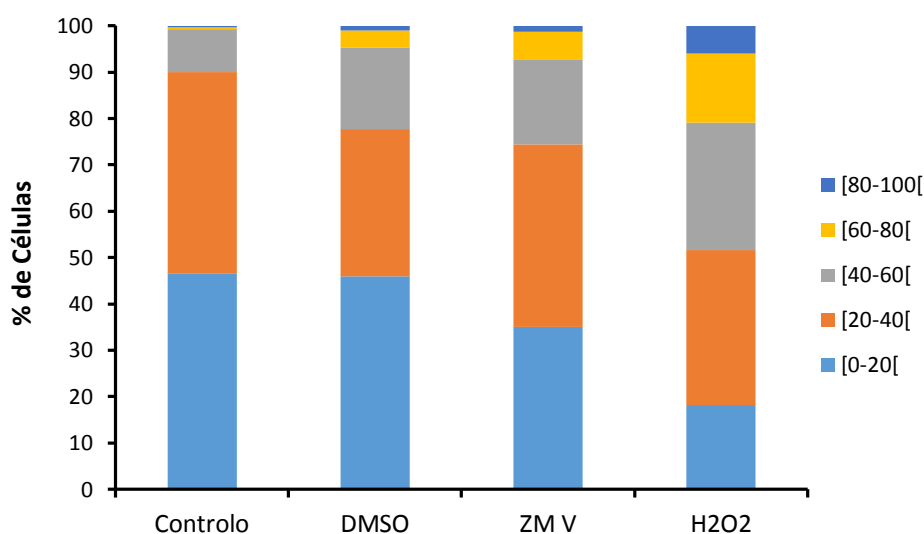


Figura 3.13 – Distribuição do nível de danos apresentado por células HCT116 incubadas na ausência de composto e DMSO (controlo) ou na presença de 0,1 % (v/v) de DMSO, 0,1 μM de ZM V ou 0,05 % (v/v) de H_2O_2 . Os danos são avaliados por percentagem de DNA na cauda do cometa, sendo contabilizados 100 cometas por lâmina.

Para uma visualização geral do nível de danos apresentados em cada condição determinou-se o valor médio de DNA presente na cauda do cometa (Figura 3.14). O controlo negativo apresenta em média 23,0 % de DNA na cauda, um valor relativamente baixo tendo em conta que estas células não foram expostas a nenhum agente anti-tumoral ou indutor de

quebras no DNA. Assim, esta amostra é a que apresenta menores danos no DNA, tal como era expectável. A técnica de recolha de células pelo método de *scraping* pode induzir algum *stress* nas células pelo que estas apresentam sempre alguma percentagem de quebras no DNA. Por outro lado, o H_2O_2 é o que apresenta maiores danos provocados, 40,68 % de DNA na cauda, o que era previsível tendo em conta a sua capacidade de indução de quebras no DNA. A amostra incubada com DMSO revela danos superiores ao controlo, 26,51 % de DNA na cauda. Células incubadas com o composto ZM V apresentam em média 29,46 % de DNA na cauda, um valor superior ao verificado nas células controlo e no DMSO, mas inferior ao do H_2O_2 , comprovando a capacidade do composto em clivar o DNA. Apesar deste resultado, o aumento de quebras no DNA incubado com ZM V não é tão significativo como esperado tendo em conta os resultados obtidos para o ensaio de interacção com o pDNA e o ensaio de marcação com Anexina V-FITC e IP. Pode-se então supor que a toxicidade do ZM V possa ter um mecanismo de acção para outros alvos biológicos para além do DNA, como por exemplo interacção com proteínas vitais para a célula.

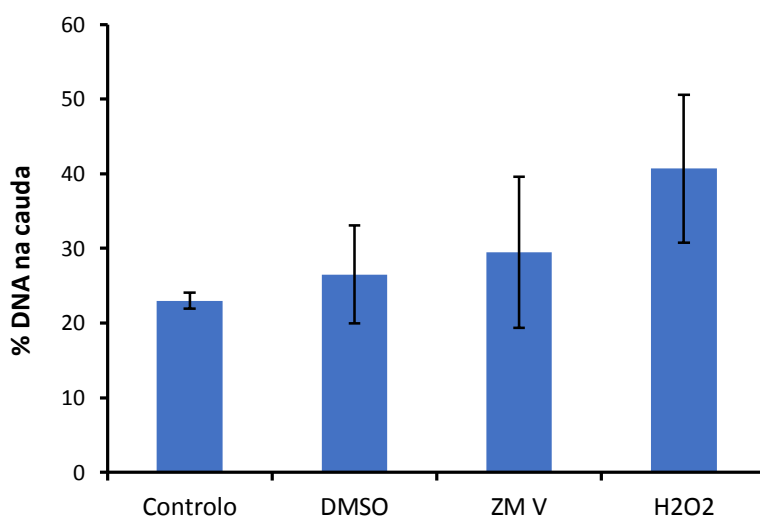


Figura 3.14 – Representação gráfica da média de percentagem de DNA na cauda do cometa para cada uma das condições estudadas em células tumorais HCT116: controlo negativo, 0,1 % (v/v) de DMSO, 0,1 μ M de ZM V e 0,05 % (v/v) de H_2O_2 . Os valores são relativos à média de três ensaios independentes e as barras de erro representam o erro padrão em relação à média.

3.7. PROTEÓMICA

Com o objectivo de estudar as vias celulares afectadas pela presença do composto, procedeu-se ao estudo da avaliação da expressão proteica de células tumorais HCT116 após exposição a 0,07 μ M de ZM V (concentração correspondente ao valor de IC_{50} relativo determinado para esta linha celular) através de electroforese bidimensional (focagem isoelectrica e SDS-PAGE). Os géis obtidos foram analisados no programa Melanie 7.0, sendo as proteínas identificadas por espectroscopia de massa Maldi-TOF.

Foram identificadas 36 proteínas distintas (Figura 3.15), das quais 14 apresentam variações de expressão significativas (Tabela 3.2). O nível de expressão da cada proteína foi calculada pela razão entre a intensidade do *spot* na amostra do composto e a intensidade do *spot* no controlo (DMSO), considerando-se sub-expressão para valores inferiores a 0,7 e sobre-expressão para valores superiores a 1,5.

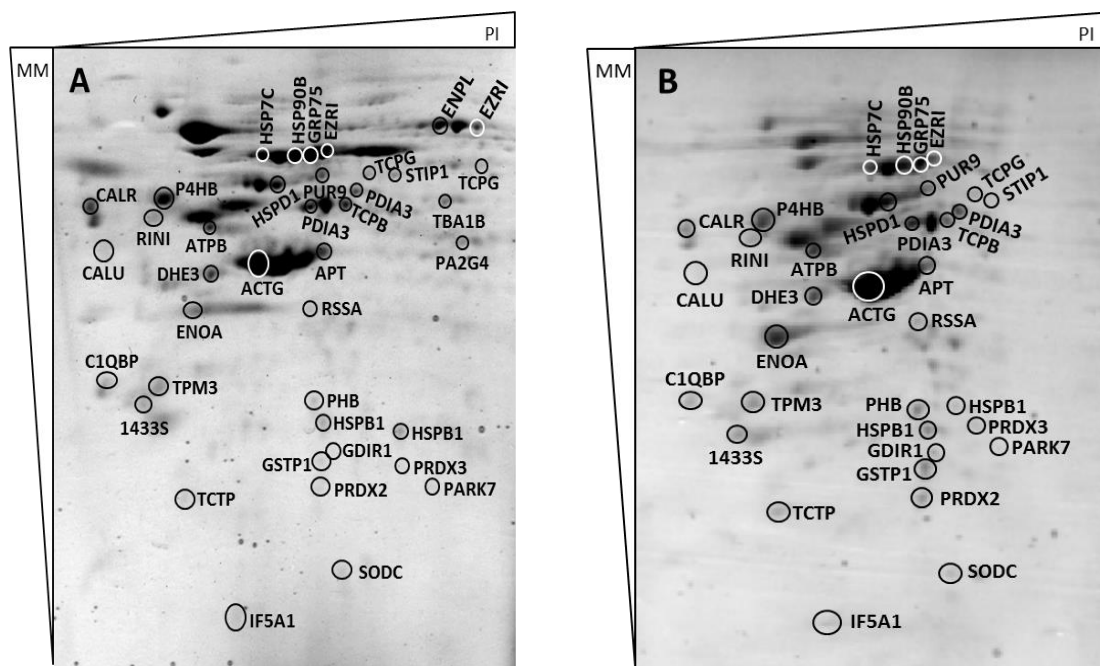


Figura 3.15 – Géis resultantes de electroforese bidimensional de extractos proteicos de células tumorais HCT116 incubadas com (A) 0,15 % (v/v) de DMSO ou (B) 0,07 μ M de ZM V durante 24 h. Os géis foram analisados no programa Melanie 7.0. Os *spots* identificados representam proteínas com respectiva sigla do nome.

Tabela 3.2 – Proteínas identificadas nos géis resultantes da electroforese bidimensional com identificação do ponto isoelectrico (pI), massa molecular (MM) e variação da expressão relativamente ao controlo, cujos valores resultam da média de três ensaios independentes. Valores inferiores a 0,7 foram considerados sub-expressão e valores superiores a 1,5 referem-se a sobre-expressão.

Abreviatura	Identificação da proteína (em inglês)	pI	MM (Da)	Variação da Expressão
ACTG	<i>Actin, cytoplasmic 2</i>	5,31	41765,8	0,587
ATPB	<i>ATP synthase subunit beta, mitochondrial</i>	5,26	56524,6	2,366
C1QBP	<i>Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial</i>	4,74	31342,6	2,064
CALR	<i>Calreticulin</i>	4,29	48111,8	1,581
CALU	<i>Calumenin</i>	4,47	37083,5	0,558

DHE3	<i>Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial</i>	7,66	61359,2	1,947
GDIR1	<i>Rho GDP-dissociation inhibitor 1</i>	5,02	23192,7	0,485
GSTP1	<i>Glutathione S-transferase P</i>	5,43	23341	2,119
HSPB1	<i>Heat shock protein beta-1</i>	5,98	22768,5	1,597
HSPD1	<i>60 kDa heat shock protein, mitochondrial</i>	5,70	61016,4	1,830
P4HB	<i>Protein disulfide-isomerase</i>	4,76	57080,7	1,874
PDIA3	<i>Protein disulfide-isomerase A3</i>	5,98	56746,8	1,891
TCPB	<i>T-complex protein 1 subunit beta</i>	6,01	57452,1	1,601
TCTP	<i>Translationally-controlled tumor protein</i>	4,84	19582,6	3,031

As actinas pertencem a uma família de proteínas do citoesqueleto que desempenham um importante papel na contração muscular, mobilidade celular e manutenção da estrutura do citoesqueleto (Dugina *et al.*, 2009; Höfer *et al.*, 1997; Chou *et al.*, 1987). A γ -actina, ou ACTG, é uma proteína citoplasmática expressa em células não-musculares essencial para a sobrevivência da célula (Belyantseva *et al.*, 2009; Dugina *et al.*, 2009). A sub-expressão de ACTG pode ser um indicativo da existência de um mecanismo de remodelação do citoesqueleto e, conseqüentemente, da alteração da forma da célula (Milli *et al.*, 2011). Assim, as alterações na organização dos filamentos de actina, resultantes da sub-expressão da proteína ACTG observada em células expostas ao ZM V, são essenciais para o processo apoptótico, uma vez que, a formação de vesículas membranares ocorrida durante a apoptose está associada à redução dos filamentos de actina (Guénal *et al.*, 1997). Assim, pressupõe-se que as modificações no citoesqueleto são uma consequência da resposta das células à acção do composto ZM V, contribuindo para as alterações morfológicas características da apoptose.

As células tumorais requerem alterações metabólicas como forma de resposta adaptativa aos sinais proliferativos e às necessidades de crescimento e divisão celular. Assim, estas células trocam a produção de ATP através de fosforilação oxidativa pela produção de ATP através de glicólise, que é um processo mais rápido do que a fosforilação oxidativa e que proporciona uma vantagem metabólica para células proliferativas (Cairns *et al.*, 2011; Weinberg *et al.*, 2010). Nesta via, a glutamina é convertida em glutamato que entra no ciclo do ácido tricarboxílico onde é convertido em α -cetoglutarato pela aminotransferase ou pela enzima glutamato desidrogenase (denominada DHE3) (Cairns *et al.*, 2011; Weinberg *et al.*, 2010). Por outro lado, a ATP sintase é uma proteína mitocondrial responsável pela conversão do ADP em ATP através de fosforilação oxidativa, sendo a subunidade β do domínio F_1 , denominada por β - F_1 -ATPase ou ATPB, correspondente à subunidade catalítica da ATP sintase (Zheng *et al.*, 2011; Maguire *et al.*, 2006; Wall *et al.*, 2001). Este componente encontra-se codificado no gene *ATP5B* que se apresenta frequentemente sub-expresso em tumores humanos devido às

alterações metabólicas acima referidas (Willers *et al.*, 2010; Maguire *et al.*, 2006). Verifica-se que a proteína DHE3, que está envolvida no principal mecanismo de produção de ATP em células tumorais, se encontra sobre-expressa dando a indicação de um aumento metabólico nas células como resposta à presença do composto ZM V e à necessidade de síntese de novas proteínas e iniciação de cascatas biológicas. A proteína ATPB também se encontra sobre-expressa dando indicação do aumento metabólico da célula e da activação da produção de ATP pela fosforilação oxidativa. Tendo em conta os níveis de apoptose já verificados em células incubadas com ZM V é possível que a mitocôndria apresente danos, provocando a dissociação da ATPB e a sua inactivação levando, consequentemente, ao aumento compensatório da síntese desta proteína.

A C1QBP (do inglês, *complement 1q binding protein*) é uma proteína globular que interage com o primeiro componente da via clássica do sistema do complemento, C1q (McGee *et al.*, 2011; Leigh *et al.*, 1998). A C1QBP localiza-se na matriz mitocondrial e suprime a permeabilidade mitocondrial constituindo um inibidor da apoptose por via intrínseca. A C1QBP tem-se revelado importante na regulação de mecanismos de proliferação celular e resistência à morte celular induzida por compostos com capacidade anti-tumoral, encontrando-se sobre-expressa em células HCT116 (McGee *et al.*, 2011). É possível observar um aumento dos níveis desta proteína em células expostas ao ZM V indicando a activação dos mecanismos de resistência aos danos mitocondriais como consequência da indução da apoptose pela via intrínseca por parte do composto.

A calreticulina (CALR) é uma chaperona presente no retículo endoplasmático estando envolvida em diversas funções celulares, tais como regulação do *folding* de proteínas e manutenção da homeostasia do Ca^{2+} (Michalak *et al.*, 2009; Afshar *et al.*, 2005). A translocação desta proteína para a superfície celular está associada à apoptose, uma vez que funciona como antígeno tornando as células mais atractivas para a fagocitose e para o *uptake* por parte de células apresentadoras de antígenos e células dendríticas (Oh *et al.*, 2012; Pierrard *et al.*, 2012; Michalak *et al.*, 2009). A libertação de Ca^{2+} a partir do retículo endoplasmático está envolvida na indução da apoptose. Assim, a sobre-expressão da CALR leva ao aumento do armazenamento de Ca^{2+} no retículo endoplasmático e ao aumento da libertação de citocromo c, resultando numa maior sensibilidade das células à apoptose (Michalak *et al.*, 2009). Células expostas ao ZM V apresentam sobre-expressão da CALR promovendo a estimulação da apoptose através da libertação de Ca^{2+} , estando de acordo com os resultados obtidos no ensaio de citometria de fluxo que revelou uma grande percentagem de células em apoptose. Os níveis da CALR também têm de ser superiores, uma vez que a proteína é translocada para a superfície celular onde ajuda no reconhecimento dos corpos apoptóticos por células fagocitárias que irão proceder à sua remoção.

A calumenina (CALU) pertence a uma família de proteínas de ligação ao Ca^{2+} denominada CREC (do inglês, *Cab45, reticulocalbin, ERC-55, calumenin*) (Cho *et al.*, 2009). Estas proteínas localizam-se no retículo endoplasmático, mas a CALU é a única que se encontra distribuída por toda a via secretória (Ostergaard *et al.*, 2006; Honoré e Vorum, 2000). A CALU está associada à libertação/captação do Ca^{2+} pelo que alterações na sua expressão são consistentes com perturbações de Ca^{2+} (Amodio *et al.*, 2011). Esta proteína pode ainda ser translocada do retículo endoplasmático para o citosol durante a paragem do ciclo celular e apoptose tardia,

mas durante as fases iniciais da apoptose está significativamente reduzida no citosol (Bull *et al.*, 2010). Como foi observado por citometria de fluxo, após 48 h de incubação com ZM V as células encontram-se maioritariamente em apoptose tardia pelo se pressupõe que após 24 h de incubação (período utilizado no ensaio de proteómica) as células devem estar em fases iniciais da apoptose, apresentando portanto baixos níveis de CALU no citosol devido à sua sub-expressão ou degradação proteolítica (Bull *et al.*, 2010).

A GDIR1 apresenta um importante papel no controlo de várias funções celulares através da interacção com a família de GTPases, na qual se insere a Rac1 (Zhang *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2003). A GDIR1 forma um complexo com a Rac1 impedindo que esta seja clivada pela caspase 3 mantendo a Rac1 no seu estado activo (Zhang *et al.*, 2005). A GDIR1 encontra-se sobre-expressa em células tumorais de cancro colorectal e promove a resistência das células à apoptose induzida por agentes quimioterapêuticos (Zhao *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2005). Neste caso, os baixos níveis de GDIR1 observados indicam que as células são susceptíveis à apoptose induzida pelo ZM V, uma vez que a falta de GDIR1 deixa a Rac1 exposta à clivagem por parte da caspase 3, sendo este um evento essencial para a indução da apoptose por um agente anti-tumoral (Zhang *et al.*, 2005). Pressupõe-se assim que o ZM V tem capacidade de contornar a resistência à apoptose promovida pela GDIR1. Estes resultados encontram-se de acordo com o indicado no ensaio de citometria de fluxo e também pelas alterações na expressão de proteínas como a CALR e a CALU.

A GSTP1 é um membro da família das glutathionas S-transferases que catalisam a conjugação de xenobióticos com a glutathiona no processo de destoxificação para que sejam removidos da célula (Han *et al.*, 2013; Burns *et al.*, 2005; Dang *et al.*, 2005). Uma vez que, a GSTP1 protege as células do *stress* oxidativo, o aumento da sua expressão está associado à protecção das células contra a apoptose (Dang *et al.*, 2005). Os níveis aumentados desta proteína resultam da resposta celular à presença do ZM V com a finalidade de proteger a célula de danos ou até da morte celular. Apesar de o aumento de expressão da GSTP1 corresponder a um mecanismo de defesa da célula também indica o tipo de acção do ZM V, uma vez que os níveis da proteína aumentam como consequência da formação de ROS, que é um processo bastante comum em complexos de cobre, como acontece com o composto bis(1-10-fenantrolina)-cobre(II) (da Silveira *et al.*, 2008; Mookerjee *et al.*, 2006). Este composto liga-se ao sulco menor do DNA e, através de uma reacção semelhante à de Fenton, formam-se ROS devido à redução do cobre pela glutathiona ou pelo ascorbato, seguindo-se a oxidação do metal na presença de H₂O₂ (García-Giménez *et al.*, 2009; da Silveira *et al.*, 2008). Os ROS podem então provocar a oxidação da ribose ou das bases (Dhar *et al.*, 2003; Humphreys *et al.*, 2002).

As HSP (do inglês, *heat shock protein*) podem actuar como chaperonas, regulando o correcto *folding* das proteínas e facilitando o *refolding*, de forma a protegerem a célula do *stress* induzido por hipoxia, choque térmico, privação de glucose, radicais tóxicos, carcinogénicos, terapia hormonal e quimioterapia (Zoubeidi e Gleave, 2012; Sarto *et al.*, 2000). As HSP estão presentes no citosol, mitocôndria, retículo endoplasmático, núcleo e membrana (Sarto *et al.*, 2000). A expressão da HSPB1 aumenta como resposta à quimioterapia, inibindo a apoptose induzida pelos agentes anti-tumorais (Gibert *et al.*, 2011). Esta resistência à apoptose pode ser conseguida através de vários mecanismos, tais como inibição de componentes das vias apoptóticas, inibição da activação de caspases através da captação do

citocromo c citoplasmático ou da interacção com a caspase 3 e estabilização dos filamentos de actina prevenindo a disrupção do citoesqueleto (Gibert *et al.*, 2011; Concannon *et al.*, 2003). Desta forma, o aumento dos níveis de HSPB1 representa um mecanismo de defesa das células contra os danos induzidos pelo ZM V, uma vez que executa a tradicional função de chaperona na célula. Apesar da sobre-expressão de HSPB1, verifica-se que a acção do composto ZM V leva à indução da apoptose (ensaio de citometria de fluxo) e à desestabilização dos filamentos de actina (sub-expressão da ACTG), demonstrando que este mecanismo de defesa pode estar comprometido ou pouco activo.

A HSPD1 é uma proteína associada à matriz mitocondrial essencial para o transporte de proteínas do citoplasma para a mitocôndria. Em células proliferativas, a pró-caspase 3 forma complexos com a HSPD1, mas durante a apoptose a pró-caspase 3 é activada e dissocia-se da HSPD1, que por sua vez se liberta da mitocôndria. No citosol a HSPD1 acelera a maturação da pró-caspase 3 através da activação de proteínas a montante da cascata apoptótica assumindo uma função pró-apoptótica (Ciocca *et al.*, 2013; Sarto *et al.*, 2000). Em condições que estimulam a apoptose, como demonstrado pela exposição das células HCT116 ao composto ZM V, a HSPD1 encontra-se sobre-expressa pelo que deve estimular a activação da caspase 3 e, consequentemente, ajudar na execução da apoptose.

As PDI (do inglês, *protein disulfide-isomerase*) são enzimas do retículo endoplasmático onde podem funcionar como chaperonas, estando envolvidas no *folding* de proteínas. As proteínas PDIA3 e P4HB fazem parte da família PDI e a sua expressão aumenta como resposta ao *stress* celular (Pierrard *et al.*, 2012; Pressinotti *et al.*, 2009; Gruber *et al.*, 2006). Assim, a sobre-expressão destas duas proteínas revela a activação de mais um mecanismo de defesa contra os danos provocados pelo ZM V.

A TCPB é uma chaperona citoplasmática que promove o *folding* de proteínas num processo dependente de ATP, entre as quais se destacam os principais constituintes do citoesqueleto, a actina e tubulina, e muitas proteínas envolvidas na progressão do ciclo celular, tais como as ciclinas E e B (Boudiaf-Benmammar *et al.*, 2013; Pierrard *et al.*, 2012; Brackley e Grantham, 2009). Assim, baixos níveis de TCPB estão associados à inibição da proliferação celular, paragem do ciclo celular e apoptose (Boudiaf-Benmammar *et al.*, 2013). A sobre-expressão desta proteína dá indicação de que não ocorre paragem do ciclo celular pois contribui para a expressão das ciclinas E e B que estão associadas à transição G1/S e G2/M, respectivamente (Garrett, 2001). Este resultado vai de encontro ao obtido no estudo da progressão do ciclo celular por citometria de fluxo, que não revela paragem do ciclo mas sim um ligeiro atraso na progressão do mesmo. Tal como outras chaperonas, também a TCPB se encontra incluída no mecanismo de defesa da célula contra a acção de agentes anti-tumorais, como poderá ser potencialmente o ZM V.

A TCTP é uma proteína citoplasmática que se associa à tubulina durante o ciclo celular. Assim, a TCTP encontra-se ligada aos microtúbulos durante as fases G1, S, G2 e no início da mitose e ligada ao fuso durante a mitose, desligando-se na transição metáfase/anáfase (Arcuri *et al.*, 2004; Yarm, 2002; Gachet *et al.*, 1999). A sobre-expressão de TCTP provoca alterações na morfologia e citoesqueleto da célula, estabiliza os microtúbulos provocando o atraso do início da mitose e, consequentemente, leva ao atraso do crescimento e proliferação celular

(Arcuri *et al.*, 2004; Gachet *et al.*, 1999). Assim, os elevados níveis de TCTP observados em células expostas ao ZM V revelam um possível atraso na divisão celular e alterações na proliferação celular devido à estabilização dos microtúbulos, resultados esses que vão de encontro aos já obtidos por citometria de fluxo no estudo da progressão do ciclo celular e também no ensaio de marcação com Hoechst 33258, no qual é observável a diminuição de células em divisão celular comparativamente com a amostra controlo. A TCTP também interage com a Bcl-XL, uma proteína anti-apoptótica, promovendo a protecção das células contra a apoptose (Wong, 2011; Yao *et al.*, 2009). Em estudos realizados por Yao e colaboradores (2009), a incubação de 24 h com a oxaliplatina revelou um aumento dos níveis de TCTP, estimulado pela presença do composto, seguindo-se um decréscimo desses níveis às 48 e 72 h de incubação, possivelmente devido à resposta apoptótica. Desta forma é possível que a sobre-expressão observada nas células HCT116 expostas ao ZM V seja a resposta inicial à presença do composto e que esses valores diminuam com um maior período de incubação.

No geral, o estudo do proteoma de células HCT116 expostas ao composto ZM V revela dois tipos de resposta: uma que se encontra directamente associada ao efeito anti-tumoral do composto e que leva ao aumento dos níveis de proteínas pró-apoptóticas, como é o caso da CALR, CALU, HSPD1 e TCTP, e outro efeito que resulta da tentativa de sobrevivência da célula aos danos introduzidos pela acção do ZM V, através da activação de mecanismos anti-apoptóticos. Seria pertinente proceder ao estudo do proteoma de células HCT116 incubadas com composto ZM V durante maiores períodos de tempo com o objectivo de verificar o nível de expressão das proteínas ao longo do tempo de forma a comprovar os mecanismos de adaptação celular acima referidos. Este ensaio permitiria avaliar as variações de expressão de proteínas inerentes aos mecanismos de resistência e adaptação ao composto ZM V fornecendo, desta forma, respostas mais concretas do mecanismo de acção do ZM V.

No entanto, pode-se pressupor que o composto ZM V apresenta um campo de acção abrangente provocando danos em diversos componentes biológicos obtendo-se como resposta alterações no citoesqueleto, na homeostasia do Ca^{2+} e no metabolismo energético. É possível que os danos sejam induzidos pela produção de ROS, que são fortes indutores de danos oxidativos por toda a célula, pois verifica-se um aumento dos níveis de GSTP1 e também de proteínas que são estimuladas na presença de *stress* oxidativo para protecção das células, como é o caso da HSPB1, da P4HB e da PDIA3. Neste sentido foram realizados ensaios específicos para detecção de ROS, nomeadamente ensaios de detecção de actividade da glutathione S-transferase e de peroxidação lipídica, e ensaios de actividade da catalase e da superóxido dismutase.

3.8. DETECÇÃO DE ROS

Os complexos de cobre induzem a formação de ROS, tais como radicais superóxido e hidroxilo, através das reacções de Fenton e de Haber-Weiss causando danos em macromoléculas como o DNA, proteínas e lípidos (Han *et al.*, 2013; Iakovidis *et al.*, 2011). Com a realização do ensaio de *Comet* verificou-se que o composto ZM V provoca quebras no DNA possivelmente devido à formação de ROS. Desta forma, procedeu-se ao estudo de uma enzima de *stress* oxidativo, GST, e do composto MDA, derivado de peroxidação lipídica, a fim de estudar este mecanismo de acção. Realizou-se então a incubação de células tumorais HCT116 com 0,1 % (v/v) de DMSO e 0,05 μ M de ZM V efectuando-se de seguida a extracção da proteína total que foi utilizada nos ensaios de detecção de ROS.

3.8.1. ENSAIO DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE

A GST é uma enzima de destoxificação de fase II capaz de conjugar xenobióticos com substratos endógenos solúveis em água, como a GSH, tornando-os mais susceptíveis de serem removidos da célula (Burns *et al.*, 2005; Sheehan *et al.*, 2001). A GST também pode estar envolvida no mecanismo de defesa contra danos oxidativos (remoção de ROS) e catalisa a conjugação com ligandos endógenos e reacções da via metabólica não associada à destoxificação (Han *et al.*, 2013; Burns *et al.*, 2005; Sheehan *et al.*, 2001).

A GST catalisa a conjugação do CDNB à GSH originando o produto GS-DNB, cuja variação da absorvância foi estudada, sendo que o seu aumento é directamente proporcional à actividade da GST presente na amostra. Procedeu-se à adição de uma solução contendo o substrato (GSH e CDNB) à amostra proteica obtida das células HCT116, realizando-se de seguida a leitura da absorvância a 340 nm ao longo do tempo.

Para as amostras incubadas com DMSO e com ZM V (Figura 3.16) observou-se um aumento da absorvância ao longo do tempo indicando maior quantidade do produto GS-DNB e, consequentemente, um aumento da actividade da enzima GST com o decorrer do tempo. No entanto, células expostas ao ZM V revelam valores superiores de absorvância comparativamente ao controlo.

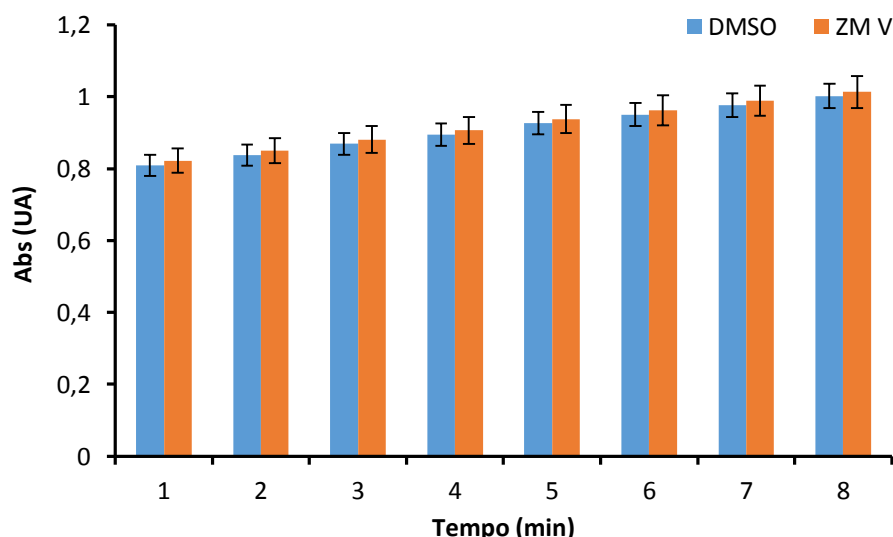


Figura 3.16 – Variação da absorvância a 340 nm do composto GS-DNB ao longo do tempo. As células HCT116 foram expostas a 0,1 % (v/v) de DMSO e 0,05 μ M de ZM V durante 24 h realizando-se, de seguida, a extracção da proteína total à qual foi adicionada uma solução contendo o substrato (GSH e CDNB). Procedeu-se, seguidamente, à leitura das absorvâncias a 340 nm durante 8 min, retirando os valores a cada 1 min, de três replicados. Os valores de absorvância apresentados correspondem à média dos triplicados e as barras de erro representam o erro padrão em relação à média.

Determinou-se o valor da actividade da GST, que foi depois normalizado em relação à concentração do extracto proteico total, sendo o desvio padrão representado pelo coeficiente de variação. Na amostra controlo, a GST apresenta uma actividade de 635,10 (\pm 4 %) μ mol/min/ μ mol de proteína e na amostra incubada com o ZM V um valor de 817,73 (\pm 7 %) μ mol/min/ μ mol de proteína, comprovando-se que a presença do composto induz uma maior actividade da enzima. Uma vez que a GST se encontra envolvida no mecanismo de protecção contra o *stress* oxidativo (Burns *et al.*, 2005; Sheehan *et al.*, 2001), o seu aumento de actividade em células expostas ao ZM V pode denunciar a necessidade da enzima para remoção do ROS produzido. Tal como referido anteriormente, o ensaio de *scavengers* seria útil para a distinção entre clivagens hidrolíticas e oxidativas do pDNA, sendo mais um indicativo da formação ou não de radicais livres. Para validação dos resultados obtidos seria necessário proceder à realização de um controlo negativo (sem adição de DMSO ou ZM V) e de um controlo positivo, por exemplo o H_2O_2 , de modo a comparar a actividade da GST na presença de ZM V com condições sem *stress* oxidativo, na qual a actividade da GST deverá ser baixa, e também com condições que potenciam uma grande actividade da enzima, uma vez que o H_2O_2 é um conhecido indutor de ROS.

O ensaio de proteómica revelou níveis elevados de GSTP1 em células incubadas com ZM V, que está de acordo com o resultado obtido para este estudo da actividade da GST, denunciando a necessidade das células expressarem maiores quantidades da enzima e em aumentar a sua actividade, com a finalidade de promover a ligação de moléculas prejudiciais com a GSH para sua remoção das células. Em conjunto ambos os ensaios indicam que o composto ZM V é um possível indutor de ROS.

3.8.2. ENSAIO DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

Para além do DNA, outros componentes celulares também estão sujeitos à acção dos ROS, tais como os fosfolípidos da membrana celular que são bastante sensíveis à oxidação e que frequentemente são alvo de danos por parte de radicais (Niki, 2009; Valko *et al.*, 2004). A peroxidação de lípidos membranares provoca diminuição da fluidez da membrana, inactivação de receptores membranares, aumento da permeabilidade aos iões e, por vezes, ruptura da membrana, embora o *stress* oxidativo desencadeie principalmente a via intrínseca da apoptose (Södergren, 2000).

O MDA é um dos principais produtos da peroxidação lipídica, podendo reagir com as bases do DNA para formar aductos (Valko *et al.*, 2004). As TBARS, que incluem o composto MDA, são utilizadas como marcadores da peroxidação lipídica (Niki, 2009). O TBA reage com o MDA formando o complexo MDA-TBA₂, que pode ser quantificado por leitura do máximo de absorvância a 532 nm (Södergren, 2000).

Determinou-se concentrações de MDA-TBA₂ de 34,53 (\pm 8,8) e 47,91 (\pm 24,8) nmol/mg de extracto proteico para amostras incubadas com DMSO e com ZM V, respectivamente (Figura 3.17). Verifica-se, no caso de células expostas ao ZM V, uma maior concentração de complexo MDA-TBA₂ comparativamente à amostra controlo (DMSO). Uma vez que este complexo é directamente proporcional ao MDA presente numa amostra, então pode-se afirmar que na amostra incubada com ZM V existe maior concentração de MDA do que na amostra controlo. Tratando-se o MDA de um produto da oxidação de lípidos, então maiores concentrações deste produto estão associadas a maiores quantidades de ROS presentes nas células. Assim, pode-se pressupor que células expostas ao ZM V apresentam maior peroxidação lipídica como resultado da acção dos ROS formados pelo composto. Para confirmação destes resultados seria necessário a determinação da concentração de MDA num controlo negativo (sem adição de DMSO ou ZM V) e num controlo positivo, utilizando por exemplo o H₂O₂. Desta forma, seria possível verificar se o valor de MDA obtido para a amostra incubada com ZM V é significativo. Também seria interessante testar outras concentrações de ZM V de forma a estudar a resposta das células e verificar se a concentração de MDA formada é dependente da concentração de composto utilizada.

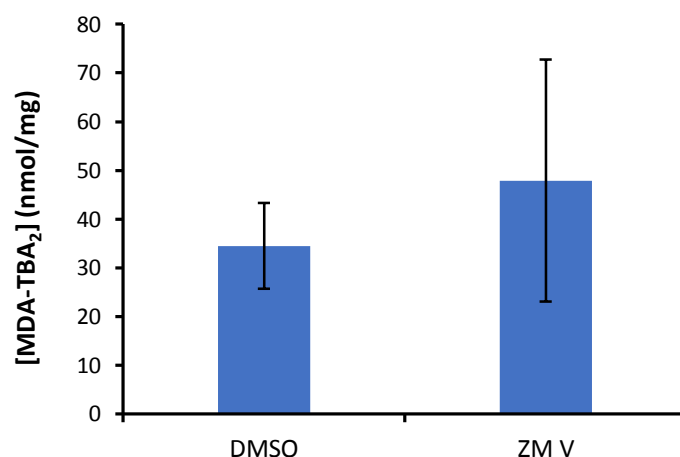


Figura 3.17 – Concentração de complexo MDA-TBA₂ presente em cada amostra. Células tumorais HCT116 foram expostas a 0,1 % (v/v) de DMSO e 0,05 μ M de ZM V durante 24 h, realizando-se de seguida a extracção da proteína total que foi utilizada para reacção com o TBA. Os valores são relativos à média dos duplicados e as barras de erro correspondem ao erro padrão em relação à média.

Através do ensaio de peroxidação lipídica e do ensaio da GST pode-se pressupor que o composto ZM V leva à produção de ROS nas células tumorais que irão afectar tanto o DNA, provocando quebras no mesmo, como outras proteínas susceptíveis à oxidação, como é o caso dos fosfolípidos. A acção dos ROS provoca então vários danos na célula com consequências graves para o funcionamento da mesma levando por fim à morte celular, provavelmente pela activação da via intrínseca da apoptose, uma vez que esta é a via mais frequentemente desencadeada pelo *stress* oxidativo e pela ocorrência de danos no DNA (Wong, 2011; Södergren, 2000).

O estudo do proteoma de células HCT116 expostas ao ZM V revelou o aumento dos níveis de proteínas associadas à resposta contra o *stress* oxidativo, como a HSPB1, a P4HB e a PDIA3. Este resultado serve de suporte à possibilidade de o ZM V induzir a formação de ROS, mas para confirmação deste mecanismo seria necessário realizar o ensaio de *scavengers* e determinar a actividade de outras enzimas envolvidas no *stress* oxidativo, como por exemplo a catalase e a superóxido dismutase.

4. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Com o objectivo de estudar o potencial anti-tumoral de um complexo de cobre, designado ZM V, procedeu-se primeiramente à avaliação do seu potencial citotóxico. A exposição de células tumorais HCT116, HepG2 e MCF-7 ao composto revelou uma acentuada diminuição da viabilidade celular determinando-se valores de IC_{50} de 0,065, 0,187 e 5,401 μ M, respectivamente. O composto ZM V apresenta maior actividade anti-proliferativa comparativamente com a cisplatina, mas relativamente à DOX tem menor actividade em células MCF-7. De seguida, avaliou-se a toxicidade do composto em células não-tumorais de fibroblastos e MCF-10A determinando-se valores de IC_{50} de 7,002 e 16,01 μ M, respectivamente, verificando-se assim que o composto tem maior toxicidade em células tumorais.

O potencial apoptótico do composto foi avaliado através de marcação das células HCT116 e HepG2 com Hoechst 33258, verificando-se condensação da cromatina e fragmentação nuclear que correspondem a características típicas da apoptose. Através da dupla marcação de células HCT116 com Anexina V-FITC e IP observou-se, por citometria de fluxo, uma diminuição em 50 % das células viáveis e um aumento de aproximadamente 5 vezes das células em apoptose inicial e de 3 vezes para células em apoptose tardia, sendo nessa fase que se encontravam a maioria das células expostas ao composto. O número de células necróticas não apresentou variações pelo que se conclui que o principal mecanismo de morte celular desencadeado pelo composto é a apoptose. O estudo da expressão de genes apoptóticos através de RT-PCR demonstrou um aumento da razão *BAX/BCL-2* a partir das 3 h de incubação, indicativo na iniciação da cascata apoptótica, e um aumento da expressão de *CASP3* a partir das 6 h de exposição, indicativo do início da execução do processo apoptótico. Conjuntamente com os ensaios anteriores verifica-se, mais uma vez, que a acção do composto ZM V passa pela indução do processo apoptótico.

As células HCT116 expostas ao ZM V parecem apresentar um ligeiro atraso na progressão do ciclo celular, uma vez que, após 8h de incubação apresentam maior número de células em G0/G1 e em S e menor número em G2/M comparativamente com a amostra controlo. Para a exposição de 24 h com ZM V verificou-se um menor número de células em G0/G1 e maior número em S e G2/M, relativamente ao controlo. Contudo, o efeito observado não foi muito acentuado pelo que será necessário outros estudos que comprovem o atraso na progressão do ciclo celular. Pretende-se portanto realizar o estudo da expressão de genes envolvidos na regulação do ciclo celular, especificamente das ciclinas D1, D2, D3 e E2 e das cdk2, 4 e 6, através de RT-PCR.

Estudos de espectroscopia de absorção indicaram a existência de interacção com o CT-DNA possivelmente por ligação do composto aos sulcos do DNA, uma vez que foi observado hipocromismo sem efeito batocrómico, o que indica que não ocorre intercalação. Determinou-se o valor da constante de ligação para o composto, $1,39 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, que se mostra inferior ao da DOX, indicando que o ZM V tem menor capacidade de ligação ao DNA. Estudos de clivagem do pDNA apontam para a ocorrência de quebras em cadeia dupla, pois a forma I foi convertida directamente na forma III, sendo que para quebras em cadeia simples se verificaria a passagem da forma I para a II e só depois para a forma III, caso que não se observou para este

composto. O mecanismo de clivagem do DNA por complexos de cobre pode ocorrer por via hidrolítica ou por via oxidativa (Li *et al.*, 2009), pelo que seria interessante identificar qual dos mecanismos é adoptado pelo ZM V. Para tal, pretende-se realizar o ensaio de *scavengers* através do qual é possível distinguir ambos os processos, fornecendo também indicação da capacidade do ZM V em produzir ROS. O ensaio *Comet* realizado em células HCT116 permitiu, igualmente, confirmar que o composto ZM V induz quebras no DNA.

O estudo do proteoma de células HCT116 revelou alterações nos níveis de várias proteínas envolvidas em diversas vias biológicas. A diminuição dos níveis de ACTG contribuem para a destabilização do citoesqueleto contribuindo para as alterações morfológicas características da apoptose. A sobre-expressão de C1QBP sugere a activação de um mecanismo de resistência aos danos mitocondriais podendo ser indicativo da indução da apoptose por via intrínseca. A CALR e a CALU estão envolvidas na homeostasia do Ca^{2+} e as suas sobre e sub-expressão, respectivamente, denunciam maior sensibilidade das células à apoptose. A CALR também se encontra envolvida com o reconhecimento de células apoptóticas por células fagocitárias pelo que a sua sobre-expressão denuncia a activação do processo apoptótico. A GDIR1 promove a resistência à apoptose, mas os baixos níveis verificados indicam um aumento da apoptose. As HSP estão geralmente associadas com a resistência à apoptose, tal como acontece com a HSPB1, mas a HSPD1 tem uma função um pouco diferente perante condições apoptóticas contribuindo para a activação da pró-caspase 3. A TCPB e a TCTP estão envolvidas na progressão do ciclo celular e os elevados níveis destas proteínas confirmam que não ocorre paragem do ciclo celular, mas sim um possível atraso do mesmo. O aumento das proteínas DHE3 e ATPB são consequência de alterações no metabolismo energético da célula. A GSTP1 protege as células contra o *stress* oxidativo, sendo que a existência de maiores níveis desta proteína indicam a possível formação de ROS por parte do composto. De forma geral, a análise proteómica confirmou os resultados já verificados, que o composto ZM V induz a apoptose, possivelmente devido à formação de ROS, podendo ainda interferir com a progressão do ciclo celular. Uma vez que se verificou a activação de algumas proteínas envolvidas em mecanismos de resistência seria pertinente proceder ao estudo do proteoma em células incubadas com o composto durante diferentes períodos de tempo de forma a avaliar a variação da expressão dessas proteínas, confirmando os mecanismos de adaptação celular e obtendo respostas mais concretas acerca do mecanismo de acção do ZM V.

O ensaio de detecção de ROS revelou um aumento da actividade da GST, responsável pela remoção de ROS (Sheehan *et al.*, 2001), e também de MDA, o principal produto da peroxidação lipídica (Valko *et al.*, 2004). Estes resultados indicam a possível formação de ROS como consequência da acção do composto ZM V, mas são necessários ensaios adicionais para a sua confirmação. Para tal, deve proceder-se à determinação da actividade de outras proteínas envolvidas no *stress* oxidativo, tais como a catalase e a superóxido dismutase, e ainda proceder à incubação das células com outras concentrações de composto para verificar o seu efeito nas proteínas e moléculas indicadas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- Abbott, R. G., Forrest, S. e Pienta, K. J. 2006. Simulating the Hallmarks of Cancer. *Artificial Life* 12: 617-634.
- Abou-Alfa, G. 2006. Hepatocellular Carcinoma: Molecular Biology and Therapy. *Seminars in Oncology* 33: S79-S83.
- ACS 2011. *Global Cancer Facts & Figures 2nd Edition*. American Cancer Society
- Afrati, T., Pantazaki, A. A., Dendrinou-Samara, C., Raptopoulou, C., Terzis, A. e Kessissoglou, D. P. 2010. Copper inverse-9-metallacrown-3 compounds interacting with DNA. *Dalton Transactions* 39: 765-775.
- Afshar, N., Black, B. E. e Paschal, B. M. 2005. Retrotranslocation of the chaperone calreticulin from the endoplasmic reticulum lumen to the cytosol. *Molecular and cellular biology* 25: 8844-8853.
- Agrawal, A. 2010. *Oncoplastic Breast Cancer Surgery*. Abbreviated Prescribing Information 5: 124-126.
- Aguilera, A. e Gomez-Gonzalez, B. 2008. Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nature Reviews Genetics* 9: 204-217.
- Alama, A., Tasso, B., Novelli, F. e Sparatore, F. 2009. Organometallic compounds in oncology: implications of novel organotin as antitumor agents. *Drug Discov Today* 14: 500-508.
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. e Johnson, A. 2004. Cell-cycle control and cell death. *In* *Essential Cell Biology* (B. Alberts ed), 2ª ed., pp 611-636, Garland Science, New York.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. e Walter, P. 2008. Cancer. *In* *Molecular biology of the cell* (B. Alberts ed), 5ª Edição, pp 1221, Garland Science, New York.
- Alshatwi, A. A. 2010. Catechin hydrate suppresses MCF-7 proliferation through TP53/Caspase-mediated apoptosis. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 29: 167.
- Amaral, J. D., Xavier, J. M., Steer, C. J. e Rodrigues, C. M. 2010. The role of p53 in apoptosis. *Discov Med* 9: 145-152.
- Amodio, G., Moltedo, O., Monteleone, F., D'Ambrosio, C., Scaloni, A., Remondelli, P. e Zambrano, N. 2011. Proteomic signatures in thapsigargin-treated hepatoma cells. *Chem Res Toxicol* 24: 1215-1222.
- Anand, P., Kunnumakara, A. B., Sundaram, C., Harikumar, K. B., Tharakan, S. T., Lai, O. S., Sung, B. e Aggarwal, B. B. 2008. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharmaceutical research* 25: 2097-2116.
- André, T., Boni, C., Mounedji-Boudiaf, L., Navarro, M., Tabernero, J., Hickish, T., Topham, C., Zaninelli, M., Clingan, P., Bridgewater, J., Tabah-Fisch, I. e de Gramont, A. 2004. Oxaliplatin, Fluorouracil, and Leucovorin as Adjuvant Treatment for Colon Cancer. *The New England Journal of Medicine* 350: 2343-2351.
- Antoniou, A. C., Spurdle, A. B., Sinilnikova, O. M., Healey, S., Pooley, K. A., Schmutzler, R. K., Versmold, B., Engel, C., Meindl, A., Arnold, N., Hofmann, W., Sutter, C., Niederacher, D., Deissler, H., Caldes, T., *et al.* 2008. Common breast cancer-predisposition alleles are associated with breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Am J Hum Genet* 82: 937-948.

- Anzola, M. 2004. Hepatocellular carcinoma: role of hepatitis B and hepatitis C viruses proteins in hepatocarcinogenesis. *Journal of Viral Hepatitis* 11: 383-393.
- Arcuri, F., Papa, S., Carducci, A., Romagnoli, R., Liberatori, S., Riparbelli, M. G., Sanchez, J. C., Tosi, P. e del Vecchio, M. T. 2004. Translationally controlled tumor protein (TCTP) in the human prostate and prostate cancer cells: expression, distribution, and calcium binding activity. *Prostate* 60: 130-140.
- Ashkenazi, A. e Herbst, R. S. 2008. To kill a tumor cell: the potential of proapoptotic receptor agonists. *The Journal of clinical investigation* 118: 1979-1990.
- Aslanoglu, M. 2006. Electrochemical and spectroscopic studies of the interaction of proflavine with DNA. *Analytical Sciences* 22: 439-443.
- ATCC: The Global Bioresource Center 2012. http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CCL-247.aspx?geo_country=pt (Acedido em Junho 2013).
- ATCC: The Global Bioresource Center 2012. http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HB-8065.aspx?geo_country=pt (Acedido em Junho 2013).
- ATCC: The Global Bioresource Center 2012. http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-22.aspx?geo_country=pt (Acedido em Junho 2013).
- ATCC: The Global Bioresource Center 2012. http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-10317.aspx?geo_country=pt (Acedido em Junho 2013).
- Barcellos-Hoff, M. H., Park, C. e Wright, E. G. 2005. Radiation and the microenvironment - tumorigenesis and therapy. *Nature Reviews Cancer* 5: 867-875.
- Beckmann, M. W., Niederacher, D., Schnürch, H. G., Gusterson, B. A. e Bender, H. G. 1997. Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. *Journal of Molecular Medicine* 75: 429-439.
- Belyantseva, I. A., Perrin, B. J., Sonnemann, K. J., Zhu, M., Stepanyan, R., McGee, J., Frolenkov, G. I., Walsh, E. J., Friderici, K. H., Friedman, T. B. e Ervasti, J. M. 2009. γ -Actin is required for cytoskeletal maintenance but not development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 9703-9708.
- Bergers, G. e Benjamin, L. E. 2003. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature Reviews Cancer* 3: 401-410.
- Blagosklonny, M. V. e Pardee, A. B. 2002. The Restriction Point of the Cell Cycle. *Cell Cycle* 1: 103-110.
- Boland, C. R. 1993. The Biology of Colorectal Cancer. *Cancer* 71: 4180-4186.
- Borralho, P. M., Kren, B. T., Castro, R. E., da Silva, I. B., Steer, C. J. e Rodrigues, C. M. 2009. MicroRNA-143 reduces viability and increases sensitivity to 5-fluorouracil in HCT116 human colorectal cancer cells. *Federation of European Biochemical Societies Journal* 276: 6689-6700.
- Boudiaf-Benmammar, C., Cresteil, T. e Melki, R. 2013. The Cytosolic Chaperonin CCT/TRiC and Cancer Cell Proliferation. *PLoS ONE* 8: e60895.
- Boulikas, T. e Vougiouka, M. 2003. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level (Review). *Oncol Rep* 10: 1663-1682.
- Brabec, V. e Nováková, O. 2006. DNA binding mode of ruthenium complexes and relationship to tumor cell toxicity. *Drug Resistance Updates* 9: 111-122.
- Brackley, K. I. e Grantham, J. 2009. Activities of the chaperonin containing TCP-1 (CCT): implications for cell cycle progression and cytoskeletal organisation. *Cell Stress Chaperones* 14: 23-31.

- Branum, M. E., Tipton, A. K., Zhu, S. e Que, L., Jr. 2001. Double-strand hydrolysis of plasmid DNA by dicerium complexes at 37 degrees C. *J Am Chem Soc* 123: 1898-1904.
- Bruijninx, P. C. e Sadler, P. J. 2008. New trends for metal complexes with anticancer activity. *Curr Opin Cell Biol* 12: 197-206.
- Bruix, J. e Llovet, J. M. 2002. Prognostic prediction and treatment strategy in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 35: 519-524.
- Brumatti, G., Sheridan, C. e Martin, S. J. 2008. Expression and purification of recombinant annexin V for the detection of membrane alterations on apoptotic cells. *Methods* 44: 235-240.
- Bull, V. H., Fargestad, E. M., Strozynski, M. e Thiede, B. 2010. Temporal proteome profiling of taxol-induced mitotic arrest and apoptosis. *Electrophoresis* 31: 1873-1885.
- Bunz, F. 2008. Principles of Cancer Genetics, pp 1-47, 227-257, Springer.
- Burns, C., Geraghty, R., Neville, C., Murphy, A., Kavanagh, K. e Doyle, S. 2005. Identification, cloning, and functional expression of three glutathione transferase genes from *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genetics and Biology* 42: 319-327.
- Burstein, H. J., Polyak, K., Wong, J. S., Lester, S. C. e Kaelin, C. M. 2004. Ductal Carcinoma in Situ of the Breast. *The New England Journal of Medicine* 350: 1430-1441.
- Cairns, R. A., Harris, I. S. e Mak, T. W. 2011. Regulation of cancer cell metabolism. *Nature Reviews Cancer* 11: 85-95.
- Cao, P., Cai, X., Lu, W., Zhou, F. e Huo, J. 2011. Growth Inhibition and Induction of Apoptosis in SHG-44 Glioma Cells by Chinese Medicine Formula "Pingliu Keli". *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2011: 9.
- Carvalho, C. M., Menezes, P. F., Letenski, G. C., Praes, C. E., Feferman, I. H. e Lorencini, M. 2012. *In vitro* induction of apoptosis, necrosis and genotoxicity by cosmetic preservatives: application of flow cytometry as a complementary analysis by NRU. *Int J Cosmet Sci* 34: 176-182.
- Cavaleiro, A. M. V. 2004. Complexos de metais do bloco d: estrutura e reactivade. *In Química Inorgânica Básica* (A. M. V. Cavaleiro ed), 3ª ed, pp 368, Universidade de Aveiro, Aveiro.
- CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega, 2012.
- Chabalier, C., Lamare, C., Racca, C., Privat, M., Valette, A. e Larminat, F. 2006. BRCA1 Downregulation Leads to Premature Inactivation of Spindle Checkpoint and Confers Paclitaxel Resistance. *Cell Cycle* 5: 1001-1007.
- Chabner, B. A. e Roberts, T. G., Jr. 2005. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nature Reviews Cancer* 5: 65-72.
- Cho, J. H., Song, H. O., Singaravelu, G., Sung, H., Oh, W. C., Kwon, S., Kim do, H. e Ahnn, J. 2009. Pleiotropic roles of calumenin (*calu-1*), a calcium-binding ER luminal protein, in *Caenorhabditis elegans*. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 583: 3050-3056.
- Chou, C. C., Davis, R. C., Fuller, M. L., Slovin, J. P., Wong, A., Wright, J., Kania, S., Shaked, R., Gatti, R. A. e Salser, W. A. 1987. Gamma-actin: unusual mRNA 3'-untranslated sequence conservation and amino acid substitutions that may be cancer related. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84: 2575-2579.
- Chu, E. 2008. New Treatment Strategies for Metastatic Colorectal Cancer. *CMP Medica*
- Ciocca, D. R., Arrigo, A. P. e Calderwood, S. K. 2013. Heat shock proteins and heat shock factor 1 in carcinogenesis and tumor development: an update. *Arch Toxicol* 87: 19-48.

- Collins, A. R., Dobson, V. L., Dusinska, M., Kennedy, G. e Stetina, R. 1997. The comet assay: what can it really tell us? *Mutat Res* 375: 183-193.
- Collins, A. R., Osoz, A. A., Brunborg, G., Gaivao, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C. C. e Stetina, R. 2008. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 23: 143-151.
- Concannon, C. G., Gorman, A. M. e Samali, A. 2003. On the role of Hsp27 in regulating apoptosis. *Apoptosis* 8: 61-70.
- Cook, K. M. e Figg, W. D. 2010. Angiogenesis inhibitors: current strategies and future prospects. *CA Cancer J Clin* 60: 222-243.
- Correia, A. D., Costa, M. H., Luis, O. J. e Livingstone, D. R. 2003. Age-related changes in antioxidant enzyme activities, fatty acid composition and lipid peroxidation in whole body *Gammarus locusta* (Crustacea: Amphipoda). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 289: 83-101.
- Craig, S. E. e Brady-Kalnay, S. M. 2011. Cancer cells cut homophilic cell adhesion molecules and run. *Cancer research* 71: 303-309.
- da Silveira, V. C., Luz, J. S., Oliveira, C. C., Graziani, I., Ciriolo, M. R. e da Costa Ferreira, A. M. 2008. Double-strand DNA cleavage induced by oxindole-Schiff base copper(II) complexes with potential antitumor activity. *J Inorg Biochem* 102: 1090-1103.
- Dalmay, T. e Edwards, D. R. 2006. MicroRNAs and the hallmarks of cancer. *Oncogene* 25: 6170-6175.
- Dang, D. T., Chen, F., Kohli, M., Rago, C., Cummins, J. M. e Dang, L. H. 2005. Glutathione S-transferase π 1 promotes tumorigenicity in HCT116 human colon cancer cells. *Cancer research* 65: 9485-9494.
- Danial, N. N. e Korsmeyer, S. J. 2004. Cell Death: Critical Control Points. *Cell* 116: 205-219.
- Debatin, K. M. e Krammer, P. H. 2004. Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene* 23: 2950-2966.
- Dejean, L. M., Martinez-Caballero, S., Guo, L., Hughes, C., Teijido, O., Ducret, T., Ichas, F., Korsmeyer, S. J., Antonsson, B. e Jonas, E. A. 2005. Oligomeric Bax is a component of the putative cytochrome c release channel MAC, mitochondrial apoptosis-induced channel. *Molecular biology of the cell* 16: 2424-2432.
- Desgrosellier, J. S. e Cheresch, D. A. 2010. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Cancer* 10: 9-22.
- Dhar, S., Senapati, D., Das, P. K., Chattopadhyay, P., Nethaji, M. e Chakravarty, A. R. 2003. Ternary copper complexes for photocleavage of DNA by red light: direct evidence for sulfur-to-copper charge transfer and d-d band involvement. *J Am Chem Soc* 125: 12118-12124.
- Dimitrakopoulou, A., Dendrinou-Samara, C., Pantazaki, A. A., Alexiou, M., Nordlander, E. e Kessissoglou, D. P. 2008. Synthesis, structure and interactions with DNA of novel tetranuclear, [Mn₄(II/II/II/IV)] mixed valence complexes. *J Inorg Biochem* 102: 618-628.
- Dimiza, F., Perdih, F., Tangoulis, V., Turel, I., Kessissoglou, D. P. e Psomas, G. 2011. Interaction of copper(II) with the non-steroidal anti-inflammatory drugs naproxen and diclofenac: synthesis, structure, DNA- and albumin-binding. *J Inorg Biochem* 105: 476-489.
- Douillard, J. Y., Cunningham, D., Roth, A. D., Navarro, M., James, R. D., Karasek, P., Jandik, P., Iveson, T., Carmichael, J., Alakl, M., Gruia, G., Awad, L. e Rougier, P. 2000. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *The Lancet* 355: 1041-1047.

Drummond, J. T., Anthoney, A., Brown, R. e Modrich, P. 1996. Cisplatin and adriamycin resistance are associated with MutL α and mismatch repair deficiency in an ovarian tumor cell line. *Journal of biological chemistry* 271: 19645-19648.

Dugina, V., Zwaenepoel, I., Gabbiani, G., Clément, S. e Chaponnier, C. 2009. β - and γ -cytoplasmic actins display distinct distribution and functional diversity. *J Cell Sci* 122: 2980-2988.

Edinger, A. L. e Thompson, C. B. 2004. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol* 16: 663-669.

Efthimiadou, E. K., Karaliota, A. e Psomas, G. 2010. Metal complexes of the third-generation quinolone antimicrobial drug sparfloxacin: Structure and biological evaluation. *J Inorg Biochem* 104: 455-466.

Elmore, S. 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology* 35: 495-516.

Fairbairn, D. W., Olive, P. L. e O'Neill, K. L. 1995. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res* 339: 37-59.

Fearon, E. R. e Jones, P. A. 1992. Progressing toward a molecular description of colorectal cancer development. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* 6: 2783-2790.

Festjens, N., Vanden Berghe, T. e Vandenabeele, P. 2006. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim Biophys Acta* 1757: 1371-1387.

Foulkes, W. D., Smith, I. E. e Reis-Filho, J. S. 2010. Triple-Negative Breast Cancer. *The New England Journal of Medicine* 363: 1938-1948.

Gachet, Y., Tournier, S., Lee, M., Lazaris-Karatzas, A., Poulton, T. e Bommer, U. A. 1999. The growth-related, translationally controlled protein P23 has properties of a tubulin binding protein and associates transiently with microtubules during the cell cycle. *J Cell Sci* 112: 1257-1271.

Garcia-Barros, M., Paris, F., Cordon-Cardo, C., Lyden, D., Rafii, S., Haimovitz-Friedman, A., Fuks, Z. e Kolesnick, R. 2003. Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. *Science* 300: 1155-1159.

García-Giménez, J. L., González-Álvarez, M., Liu-González, M., Macías, B., Borrás, J. e Alzueta, G. 2009. Toward the development of metal-based synthetic nucleases: DNA binding and oxidative DNA cleavage of a mixed copper(II) complex with *N*-(9*H*-purin-6-yl)benzenesulfonamide and 1,10-phenantroline. Antitumor activity in human Caco-2 cells and Jurkat T lymphocytes. Evaluation of *p53* and *Bcl-2* proteins in the apoptotic mechanism. *J Inorg Biochem* 103: 923-934.

Garrett, M. D. 2001. Cell cycle control and cancer. *Current Science* 81: 515-522.

Gewies, A. 2003. Introduction to Apoptosis. *ApoReview* 1-26.

Gewirtz, D. A. 1999. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* 57: 727-741.

Ghobrial, I. M., Witzig, T. E. e Adjei, A. A. 2005. Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. *CA Cancer J Clin* 55: 178-194.

- Gibert, B., Hadchity, E., Czekalla, A., Aloy, M. T., Colas, P., Rodriguez-Lafrasse, C., Arrigo, A. P. e Diaz-Latoud, C. 2011. Inhibition of heat shock protein 27 (HspB1) tumorigenic functions by peptide aptamers. *Oncogene* 30: 3672-3681.
- GLOBOCAN: International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, 2008. <http://globocan.iarc.fr> (Acedido em Junho 2013).
- Glutathione S-Transferase (GST) Assay Kit, Sigma.
- Goldberg, R. M., Sargent, D. J., Morton, R. F., Fuchs, C. S., Ramanathan, R. K., Williamson, S. K., Findlay, B. P., Pitot, H. C. e Alberts, S. R. 2004. A randomized controlled trial of fluorouracil plus leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin combinations in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology* 22: 23-30.
- Golstein, P. e Kroemer, G. 2007. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in Biochemical Sciences* 32: 37-43.
- Gordon, R. R. e Nelson, P. S. 2012. Cellular senescence and cancer chemotherapy resistance. *Drug Resistance Updates* 15: 123-131.
- Gottesman, M. M. 2002. Mechanisms of Cancer Drug Resistance. *Annual Review of Medicine* 53: 615-627.
- Granados-Principal, S., Quiles, J. L., Ramirez-Tortosa, C. L., Sanchez-Rovira, P. e Ramirez-Tortosa, M. 2010. New advances in molecular mechanisms and the prevention of adriamycin toxicity by antioxidant nutrients. *Food and Chemical Toxicology* 48: 1425-1438.
- Gruber, C. W., Čemažar, M., Heras, B., Martin, J. L. e Craik, D. J. 2006. Protein disulfide isomerase: the structure of oxidative folding. *Trends in Biochemical Sciences* 31: 455-464.
- Guénal, I., Risler, Y. e Mignotte, B. 1997. Down-regulation of actin genes precedes microfilament network disruption and actin cleavage during p53-mediated apoptosis. *J Cell Sci* 110 (Pt 4): 489-495.
- Gutman, M. e Fidler, I. J. 1995. Biology of Human Colon Cancer Metastasis. *World Journal of Surgery* 19: 226-234.
- Hahn, W. C., Stewart, S. A., Brooks, M. W., York, S. G., Eaton, E., Kurachi, A., Beijersbergen, R. L., Knoll, J. H. M., Meyerson, M. e Weinberg, R. A. 1999. Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. *Nature Medicine* 5: 1164-1170.
- Halliwell, B. e Gutteridge, J. M. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 186: 1-85.
- Han, J., Won, E. J., Hwang, D. S., Rhee, J. S., Kim, I. C. e Lee, J. S. 2013. Effect of copper exposure on GST activity and on the expression of four GSTs under oxidative stress condition in the monogonont rotifer, *Brachionus koreanus*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology* 158: 91-100.
- Hanahan, D. e Weinberg, R. A. 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100: 57-70.
- Hanahan, D. e Weinberg, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646-674.
- Hannon, M. J. 2007. Metal-based anticancer drugs: from a past anchored in platinum chemistry to a post-genomic future of diverse chemistry and biology. *Pure and Applied Chemistry* 79: 2243-2261.
- Helleday, T., Petermann, E., Lundin, C., Hodgson, B. e Sharma, R. A. 2008. DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 8: 193-204.
- Herceg, Z. 2007. Epigenetics and cancer: towards an evaluation of the impact of environmental and dietary factors. *Mutagenesis* 22: 91-103.

- Herr, I. 2001. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood* 98: 2603-2614.
- Ho, T. F., Ma, C. J., Lu, C. H., Tsai, Y. T., Wei, Y. H., Chang, J. S., Lai, J. K., Cheuh, P. J., Yeh, C. T., Tang, P. C., Tsai Chang, J., Ko, J. L., Liu, F. S., Yen, H. E. e Chang, C. C. 2007. Undecylprodigiosin selectively induces apoptosis in human breast carcinoma cells independent of p53. *Toxicology and Applied Pharmacology* 225: 318-328.
- Hoechst Stains, Invitrogen, 2005.
- Höfer, D., Ness, W. e Drenckhahn, D. 1997. Sorting of actin isoforms in chicken auditory hair cells. *J Cell Sci* 110: 765-770.
- Honoré, B. e Vorum, H. 2000. The CREC family, a novel family of multiple EF-hand, low-affinity Ca^{2+} -binding proteins localised to the secretory pathway of mammalian cells. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 466: 11-18.
- Humphreys, K. J., Karlin, K. D. e Rokita, S. E. 2002. Targeted strand scission of DNA substrates by a tricopper(II) coordination complex. *J Am Chem Soc* 124: 8055-8066.
- Hursting, S. D., Slaga, T. J., Fischer, S. M., DiGiovanni, J. e Phang, J. M. 1999. Mechanism-Based Cancer Prevention Approaches: Targets, Examples, and the Use of Transgenic Mice. *Journal of the National Cancer Institute* 91: 215-225.
- Iakovidis, I., Delimaris, I. e Piperakis, S. M. 2011. Copper and Its Complexes in Medicine: A Biochemical Approach. *Molecular Biology International* 2011: 1-13.
- Igney, F. H. e Krammer, P. H. 2002. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature Reviews Cancer* 2: 277-288.
- Jakóbiśiak, M., Lasek, W. e Gołb, J. 2003. Natural mechanisms protecting against cancer. *Immunology Letters* 90: 103-122.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E. e Forman, D. 2011. Global Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin* 61: 69-90.
- Johnstone, R. W., Ruefli, A. A. e Lowe, S. W. 2002. Apoptosis: A Link between Cancer Genetics and Chemotherapy. *Cell* 108: 153-164.
- Kam, P. C. A. e Ferch, N. I. 2000. Apoptosis: mechanisms and clinical implications. *Anaesthesia* 55: 1081-1093.
- Kanduc, D., Mittelman, A., Serpico, R., Sinigaglia, E., Sinha, A. A., Natale, C., Santacroce, R., Di Corcia, M. G., Lucchese, A., Dini, L., Pani, P., Santacroce, S., Simone, S., Bucci, R. e Farber, E. 2002. Cell death: apoptosis versus necrosis (review). *Int J Oncol* 21: 165-170.
- Kashanian, S., Khodaei, M. M. e Pakravan, P. 2010. Spectroscopic studies on the interaction of isatin with calf thymus DNA. *DNA Cell Biol* 29: 639-646.
- Kaufmann, S. H. e Earnshaw, W. C. 2000. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res* 256: 42-49.
- Kelsen, D. P., Ginsberg, R., Pajak, T. F., Sheahan, D. G., Gunderson, L., Mortimer, J., Estes, N., Haller, D. G., Ajani, J., Kocha, W., Minsky, B. D. e Roth, J. A. 1998. Chemotherapy followed by surgery compared with surgery alone for localized esophageal cancer. *The New England Journal of Medicine* 339: 1979-1984.
- Kepp, O., Galluzzi, L., Lipinski, M., Yuan, J. e Kroemer, G. 2011. Cell death assays for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* 10: 221-237.
- Khosravi-Far, R. e Esposti, D. M. 2004. Death Receptor Signals to Mitochondria. *Cancer Biology & Therapy* 3: 1051-1057.

- Kogure, T., Lin, W. L., Yan, I. K., Braconi, C. e Patel, T. 2011. Intercellular nanovesicle-mediated microRNA transfer: A mechanism of environmental modulation of hepatocellular cancer cell growth. *Hepatology* 54: 1237-1248.
- Köpf-Maier, P. 1994. Complexes of metals other than platinum as antitumour agents. *Eur J Clin Pharmacol* 47: 1-16.
- Köpf-Maier, P. e Köpf, H. 1987. Non-platinum-group metal antitumor agents: history, current status, and perspectives. *Chemical Reviews* 87: 1137-1152.
- Kumaravel, T. S., Vilhar, B., Faux, S. P. e Jha, A. N. 2009. Comet Assay measurements: a perspective. *Cell Biol Toxicol* 25: 53-64.
- Lapenna, S. e Giordano, A. 2009. Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. *Nature Reviews Drug Discovery* 8: 547-566.
- Leigh, L. E., Ghebrehiwet, B., Perera, T. P., Bird, I. N., Strong, P., Kishore, U., Reid, K. B. e Eggleton, P. 1998. C1q-mediated chemotaxis by human neutrophils: involvement of gC1qR and G-protein signalling mechanisms. *Biochemical Journal* 330: 247-254.
- Lewin, B. 2004. *Genes*, 8ª Edição, pp 843-937, Pearson Prentice Hall, Saddle River.
- Li, D., Tian, J., Kou, Y., Huang, F., Chen, G., Gu, W., Liu, X., Liao, D., Cheng, P. e Yan, S. 2009. Synthesis, X-ray crystal structures, magnetism, and DNA cleavage properties of copper(II) complexes with 1,4-tpbd ligand. *Dalton Transactions* 3574-3583.
- Li, Y., Liu, J. e Li, Q. 2010. Mechanisms by which the antitumor compound di-n-butyl-di-(4-chlorobenzohydroxamato)tin(IV) induces apoptosis and the mitochondrial-mediated signaling pathway in human cancer SGC-7901 cells. *Mol Carcinog* 49: 566-581.
- Liao, W., McNutt, M. A. e Zhu, W. G. 2009. The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods* 48: 46-53.
- Liu, C., Zhou, J., Li, Q., Wang, L., Liao, Z. e Xu, H. 1999. DNA damage by copper(II) complexes: coordination-structural dependence of reactivities. *J Inorg Biochem* 75: 233-240.
- Liu, Z. Q., Jiang, M., Li, Y. T., Wu, Z. Y. e Yang, J. X. 2009a. One-dimensional copper(II) polymer with bridging μ -trans-oxamidate and thiocyanate ligands: Synthesis, crystal structure and DNA binding studies. *Inorganica Chimica Acta* 362: 1253-1259.
- Liu, Z. Q., Li, Y. T., Wu, Z. Y. e Zhang, S. F. 2009b. $[\text{Cu}_4(\text{H}_2\text{O})_4(\text{dmapox})_2(\text{btc})]_n \cdot 10n\text{H}_2\text{O}$: The first two-dimensional polymeric copper(II) complex with bridging μ -trans-oxamidate and μ_4 -1,2,4,5-benzenetetracarboxylato ligands: Synthesis, crystal structure and DNA binding studies. *Inorganica Chimica Acta* 362: 71-77.
- Livak, K. J. e Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ Method. *Methods* 25: 402-408.
- Llovet, J. M., Burroughs, A. e Bruix, J. 2003. Hepatocellular carcinoma. *The Lancet* 362: 1907-1917.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Zipursky, L. e Darnell, J. 2004. Regulating the eukaryotic cell cycle. *In Molecular and cellular biology* (H. Lodish ed), 5ª Edição, pp 853-897, W. H. Freeman, Nova Iorque.
- Longley, D. B. e Johnston, P. G. 2005. Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol* 205: 275-292.
- Luís, D. V. A. 2011. Caracterização do efeito anti-tumoral de complexos organometálicos contendo 1,10-fenantrolina-5,6-diona. Tese de Mestrado. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa. (http://run.unl.pt/bitstream/10362/6265/1/Luis_2011.pdf).

- Luo, J., Solimini, N. L. e Elledge, S. J. 2009. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell* 136: 823-837.
- Lupold, S. E., Johnson, T., Chowdhury, W. H. e Rodriguez, R. 2012. A Real Time *Metridia* Luciferase Based Non-Invasive Reporter Assay of Mammalian Cell Viability and Cytotoxicity via the β -actin Promoter and Enhancer. *PLoS ONE* 7: e36535.
- Luqmani, Y. A. 2005. Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy. *Medical Principles and Practice* 14 Suppl 1: 35-48.
- Macías, B., Villa, M. V., Gómez, B., Borrás, J., Alzuet, G., González-Álvarez, M. e Castiñeiras, A. 2007. DNA interaction of new copper(II) complexes with sulfonamides as ligands. *J Inorg Biochem* 101: 444-451.
- Maguire, D., Shah, J. e McCabe, M. 2006. Assaying ATP Synthase Rotor Activity. *In Oxygen Transport to Tissue XXVII* (G. Cicco, D. F. Bruley, M. Ferrari and D. K. Harrison ed), pp 67-72, Springer US, US.
- Malumbres, M. e Barbacid, M. 2009. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Reviews Cancer* 9: 153-166.
- Marzano, C., Pellei, M., Tisato, F. e Santini, C. 2009. Copper complexes as anticancer agents. *Anticancer Agents in Medicinal Chemistry* 9: 185-211.
- Matos, M. R. P. N. 2001. Complexos Metálicos na terapêutica do Cancro. *Sociedade Portuguesa de Química* 85: 61-68.
- McGee, A. M., Douglas, D. L., Liang, Y., Hyder, S. M. e Baines, C. P. 2011. The mitochondrial protein C1qbp promotes cell proliferation, migration and resistance to cell death. *Cell Cycle* 10: 4119-4127.
- Meirow, D. e Nugent, D. 2001. The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. *Hum Reprod Update* 7: 535-543.
- Michalak, M., Groenendyk, J., Szabo, E., Gold, L. I. e Opas, M. 2009. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochemical Journal* 417: 651-666.
- Milli, A., Perego, P., Beretta, G. L., Corvo, A., Righetti, P. G., Carenini, N., Corna, E., Zuco, V., Zunino, F. e Cecconi, D. 2011. Proteomic Analysis of Cellular Response to Novel Proapoptotic Agents Related to Atypical Retinoids in Human IGROV-1 Ovarian Carcinoma Cells. *Journal of Proteome Research* 10: 1191-1207.
- Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G. e Gianni, L. 2004. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacological reviews* 56: 185-229.
- Mookerjee, A., Basu, J. M., Majumder, S., Chatterjee, S., Panda, G. S., Dutta, P., Pal, S., Mukherjee, P., Efferth, T., Roy, S. e Choudhuri, S. K. 2006. A novel copper complex induces ROS generation in doxorubicin resistant Ehrlich ascitis carcinoma cells and increases activity of antioxidant enzymes in vital organs in vivo. *BMC Cancer* 6: 267.
- Mudasir, Yoshioka, N. e Inoue, H. 1999. DNA binding of iron(II) mixed-ligand complexes containing 1,10-phenanthroline and 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline. *J Inorg Biochem* 77: 239-247.
- Natile, G. e Coluccia, M. 2001. Current status of trans-platinum compounds in cancer therapy. *Coordination Chemistry Reviews* 216-217: 383-410.
- Negrini, S., Gorgoulis, V. G. e Halazonetis, T. D. 2010. Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11: 220-228.

- Nevins, J. R. 2001. The Rb/E2F pathway and cancer. *Human Molecular Genetics* 10: 699-703.
- Niki, E. 2009. Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. *Free Radical Biology and Medicine* 47: 469-484.
- Nitiss, J. L. 2009. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer* 9: 338-350.
- O'Shaughnessy, J., Osborne, C., Pippen, J. E., Yoffe, M., Patt, D., Rocha, C., Koo, I. C., Sherman, B. M. e Bradley, C. 2011. Iniparib plus Chemotherapy in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *The New England Journal of Medicine* 364: 205-214.
- Oh, S. J., Ryu, C. K., Choi, I., Baek, S. Y. e Lee, H. 2012. Chemotherapeutic Candidate Inducing Immunological Death of Human Tumor Cell Lines. *Immune Network* 12: 66-69.
- Olive, P. L. e Banáth, J. P. 2006. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat Protoc* 1: 23-29.
- Ostergaard, M., Hansen, G. A., Vorum, H. e Honoré, B. 2006. Proteomic profiling of fibroblasts reveals a modulating effect of extracellular calumenin on the organization of the actin cytoskeleton. *Proteomics* 6: 3509-3519.
- Pang, R. W., Joh, J. W., Johnson, P. J., Monden, M., Pawlik, T. M. e Poon, R. T. 2008. Biology of hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol* 15: 962-971.
- Partridge, A. H., Burstein, H. J. e Winer, E. P. 2001. Side Effects of Chemotherapy and Combined Chemohormonal Therapy in Women With Early-Stage Breast Cancer. *Journal of the National Cancer Institute Monographs* 30: 135-142.
- Pierrard, M. A., Kestemont, P., Phuong, N. T., Tran, M. P., Delaive, E., Thezenas, M. L., Dieu, M., Raes, M. e Silvestre, F. 2012. Proteomic analysis of blood cells in fish exposed to chemotherapeutics: evidence for long term effects. *J Proteomics* 75: 2454-2467.
- Polyak, K. 2001. On the birth of breast cancer. *Biochim Biophys Acta* 1552: 1-13.
- Portt, L., Norman, G., Clapp, C., Greenwood, M. e Greenwood, M. T. 2011. Anti-apoptosis and cell survival: a review. *Biochim Biophys Acta* 1813: 238-259.
- Potter, J. D. 1999. Colorectal Cancer: Molecules and Populations. *Journal of the National Cancer Institute* 91: 916-932.
- Pressinotti, N. C., Klocker, H., Schafer, G., Luu, V. D., Ruschhaupt, M., Kuner, R., Steiner, E., Poustka, A., Bartsch, G. e Sultmann, H. 2009. Differential expression of apoptotic genes PDIA3 and MAP3K5 distinguishes between low- and high-risk prostate cancer. *Mol Cancer* 8: 130.
- Rafique, S., Idrees, M., Nasim, A., Akbar, H. e Athar, A. 2010. Transition metal complexes as potential therapeutic agents. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews* 5: 38-45.
- Rajendiran, V., Karthik, R., Palaniandavar, M., Stoeckli-Evans, H., Periasamy, V. S., Akbarsha, M. A., Srinag, B. S. e Krishnamurthy, H. 2007. Mixed-ligand copper(II)-phenolate complexes: effect of coligand on enhanced DNA and protein binding, DNA cleavage, and anticancer activity. *Inorg Chem* 46: 8208-8221.
- Ramakrishnan, S., Suresh, E., Riyasdeen, A., Akbarsha, M. A. e Palaniandavar, M. 2011. Interaction of *rac*-[M(diimine)₃]²⁺ (M=Co, Ni) complexes with CT DNA: role of 5,6-dmp ligand on DNA binding and cleavage and cytotoxicity. *Dalton Transactions* 40: 3245-3256.
- Ray, S., Bucur, O. e Almasan, A. 2005. Sensitization of prostate carcinoma cells to Apo2L/TRAIL by a Bcl-2 family protein inhibitor. *Apoptosis* 10: 1411-1418.

Rey, N. A., Neves, A., Silva, P. P., Paula, F. C., Silveira, J. N., Botelho, F. V., Vieira, L. Q., Pich, C. T., Terenzi, H. e Pereira-Maia, E. C. 2009. A synthetic dinuclear copper(II) hydrolase and its potential as antitumoral: cytotoxicity, cellular uptake, and DNA cleavage. *J Inorg Biochem* 103: 1323-1330.

Riccardi, C. e Nicoletti, I. 2006. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc* 1: 1458-1461.

Rojas, E., Lopez, M. C. e Valverde, M. 1999. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 722: 225-254.

Rosenberg, B., Van Camp, L. e Krigas, T. 1965. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* 205: 698-699.

Russo, J., Hu, Y. F., Yang, X. e Russo, I. H. 2000. Chapter 1: Developmental, Cellular, and Molecular Basis of Human Breast Cancer. *JNCI Monographs* 2000: 17-37.

Russo, J., Yang, X., Hu, Y. F., Bove, B. A., Huang, Y., Silva, I. D. C. G., Tahin, Q., Wu, Y., Higgy, N., Zekri, A. e Russo, I. H. 1998. Biological and molecular basis of human breast cancer. *Frontiers in Bioscience* 3: D944-D960.

Saltz, L. B., Cox, J. V., Blanke, C., Rosen, L. S., Fehrenbacher, L., Moore, M. J., Maroun, J. A., Ackland, S. P., Locker, P. K., Pirodda, N., Elfring, G. e Miller, L. 2000. Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine* 343: 905-914.

Sandal, T. 2002. Molecular Aspects of the Mammalian Cell Cycle and Cancer. *The Oncologist* 7: 73-81.

Sanz, D. J., Acedo, A., Infante, M., Durán, M., Pérez-Cabornero, L., Esteban-Cardenosa, E., Lastra, E., Pagani, F., Miner, C. e Velasco, E. A. 2010. A high proportion of DNA variants of *BRCA1* and *BRCA2* is associated with aberrant splicing in breast/ovarian cancer patients. *Clinical Cancer Research* 16: 1957-1967.

Sarto, C., Binz, P. A. e Mocarelli, P. 2000. Heat shock proteins in human cancer. *Electrophoresis* 21: 1218-1226.

Sauna, Z. E., Smith, M. M., Müller, M., Kerr, K. M. e Ambudkar, S. V. 2001. The Mechanism of Action of Multidrug-Resistance-Linked P-Glycoprotein. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 33: 481-491.

Schmid, F. X. 2001. Biological Macromolecules: UV-visible Spectrophotometry. *In* eLS, John Wiley & Sons, Ltd.

Shahabadi, N., Mohammadi, S. e Alizadeh, R. 2011. DNA Interaction Studies of a New Platinum(II) Complex Containing Different Aromatic Dinitrogen Ligands. *Bioinorganic Chemistry and Applications* 2011: 1-8.

Sheehan, D., Meade, G., Foley, V. e Dowd, C. 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal* 360: 1-16.

Shi, Y. 2002. Mechanisms of Caspase Activation and Inhibition during Apoptosis. *Molecular Cell* 9: 459-470.

Silva, J. F. P. 2012. Caracterização do Potencial Citotóxico e Mecanismos de Acção de um Complexo de Platina de Configuração trans em Células Animais. Tese de Mestrado. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa. (http://run.unl.pt/bitstream/10362/8688/1/Silva_2012.pdf).

Silva, P. P., Guerra, W., Silveira, J. N., Ferreira, A. M., Bortolotto, T., Fischer, F. L., Terenzi, H., Neves, A. e Pereira-Maia, E. C. 2011. Two new ternary complexes of copper(II) with tetracycline or doxycycline and 1,10-phenanthroline and their potential as antitumoral: cytotoxicity and DNA cleavage. *Inorg Chem* 50: 6414-6424.

Simstein, R., Burow, M., Parker, A., Weldon, C. e Beckman, B. 2003. Apoptosis, Chemoresistance, and Breast Cancer: Insights From the MCF-7 Cell Model System. *Experimental Biology and Medicine* 228: 995-1003.

Slamon, D. J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., Baselga, J. e Norton, L. 2001. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *The New England Journal of Medicine* 344: 783-792.

Smela, M. E., Currier, S. S., Bailey, E. A. e Essigmann, J. M. 2001. The Chemistry and biology of aflatoxin B1: from mutational spectrometry to carcinogenesis. *Carcinogenesis* 22: 535-545.

Södergren, E. 2000. Lipid peroxidation in vivo: Evaluation and application of methods for measurement. Tese de Doutorado. Uppsala University. (<http://uu.diva-portal.org/smash/get/diva2:160811/FULLTEXT01>).

Tabassum, S. e Pettinari, C. 2006. Chemical and biotechnological developments in organotin cancer chemotherapy. *Journal of Organometallic Chemistry* 691: 1761-1766.

Tamaki, H., Yamamoto, K. e Kumagai, H. 1999. Expression of Two Glutathione S-Transferase Genes in the Yeast *Issatchenkia orientalis* Is Induced by Dinitrobenzene during Cell Growth Arrest. *Journal of bacteriology* 181: 2958-2962.

Tapia, M. A., González-Navarrete, I., Dalmases, A., Bosch, M., Rodríguez-Fanjul, V., Rolfe, M., Ross, J. S., Mezquita, J., Mezquita, C., Bachs, O., Gascón, P., Rojo, F., Perona, R., Rovira, A. e Albanell, J. 2007. Inhibition of the Canonical IKK/NFkB Pathway Sensitizes Human Cancer Cells to Doxorubicin. *Cell Cycle* 6: 2284-2292.

Theophanides, T. e Anastassopoulou, J. 2002. Copper and carcinogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol* 42: 57-64.

Thorgeirsson, S. S. e Grisham, J. W. 2002. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nature Genetics* 31: 339-346.

Tomida, A. e Tsuruo, T. 2002. Drug resistance pathways as targets. *In* Anticancer Drug Development (B. C. Baguley and D. J. Kerr ed), pp 77-90, Academic Press, San Diego.

Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C. J. e Telser, J. 2004. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cell Biochemistry* 266: 37-56.

Van Cutsem, E., Köhne, C. H., Hitre, E., Zaluski, J., Chang Chien, C. R., Makhson, A., D'Haens, G., Pintér, T., Lim, R., Bodoky, G., Roh, J. K., Folprecht, G., Ruff, P., Stroh, C., Tejpar, S., *et al.* 2009. Cetuximab and Chemotherapy as Initial Treatment for Metastatic Colorectal Cancer. *The New England Journal of Medicine* 360: 1408-1417.

Wall, D. B., Kachman, M. T., Gong, S. S., Parus, S. J., Long, M. W. e Lubman, D. M. 2001. Isoelectric focusing nonporous silica reversed-phase high-performance liquid chromatography/electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry: a three-dimensional liquid-phase protein separation method as applied to the human erythroleukemia cell-line. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 15: 1649-1661.

Wang, P., Henning, S. M. e Heber, D. 2010. Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols. *PLoS ONE* 5: e10202.

- Weigelt, B., Peterse, J. L. e van 't Veer, L. J. 2005. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nature Reviews Cancer* 5: 591-602.
- Weinberg, F., Hamanaka, R., Wheaton, W. W., Weinberg, S., Joseph, J., Lopez, M., Kalyanaraman, B., Mutlu, G. M., Budinger, G. R. S. e Chandel, N. S. 2010. Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 8788-8793.
- Weinberg, R. A. 1995. The Retinoblastoma Protein and Cell Cycle Control. *Cell* 81: 323-330.
- Welch, D. R., Steeg, P. S. e Rinker-Schaeffer, C. W. 2000. Molecular biology of breast cancer metastasis: Genetic regulation of human breast carcinoma metastasis. *Breast Cancer Research* 2: 408-416.
- WHO 2012. World cancer factsheet. Cancer Research UK.
- Willers, I. M., Isidoro, A., Ortega, A. D., Fernandez, P. L. e Cuezva, J. M. 2010. Selective inhibition of β -F1-ATPase mRNA translation in human tumours. *Biochemical Journal* 426: 319-326.
- Wong, R. S. 2011. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 30: 87.
- Xu, Z. H., Chen, F. J., Xi, P. X., Liu, X. H. e Zeng, Z. Z. 2008. Synthesis, characterization, and DNA-binding properties of the cobalt(II) and nickel(II) complexes with salicylaldehyde 2-phenylquinoline-4-carboxylhydrazone. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 196: 77-83.
- Yao, Y., Jia, X. Y., Tian, H. Y., Jiang, Y. X., Xu, G. J., Qian, Q. J. e Zhao, F. K. 2009. Comparative proteomic analysis of colon cancer cells in response to Oxaliplatin treatment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1794: 1433-1440.
- Yarden, Y. 2001. Biology of HER2 and its importance in breast cancer. *Oncology* 61 Suppl 2: 1-13.
- Yarm, F. R. 2002. Plk phosphorylation regulates the microtubule-stabilizing protein TCTP. *Molecular and cellular biology* 22: 6209-6221.
- Yu, L., Ji, Y., Yu, M., Gao, S., Zou, X. e Ji, C. 2013. *Analysis of apoptosis mechanism in SGC-7901 induced by CSBE with flow cytometry and confocal laser scanning techenology. Complex Medical Engineering (CME), 2013 ICME International Conference on*, IEEE.
- Yu, M. C. e Yuan, J.-M. 2004. Environmental factors and risk for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 127: S72-S78.
- Yu, S., Zhang, G., Zhang, W., Luo, H., Qiu, L., Liu, Q., Sun, D., Wang, P. G. e Wang, F. 2012. Synthesis and Biological Activities of a 3'-Azido Analogue of Doxorubicin Against Drug-Resistant Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 13: 3671-3684.
- Yuan, Y., Bian, J. C., Liu, X. Z., Zhang, Y., Sun, Y. e Liu, Z. P. 2012. Oxidative Stress and Apoptotic Changes of Rat Cerebral Cortical Neurons Exposed to Cadmium *in Vitro*. *Biomedical and Environmental Sciences* 25: 172-181.
- Zhang, B., Zhang, Y., Dagher, M. C. e Shacter, E. 2005. Rho GDP dissociation inhibitor protects cancer cells against drug-induced apoptosis. *Cancer research* 65: 6054-6062.
- Zhang, B., Zhang, Y. e Shacter, E. 2003. Caspase 3-mediated inactivation of Rac GTPases promotes drug-induced apoptosis in human lymphoma cells. *Molecular and cellular biology* 23: 5716-5725.

Zhang, T., Otevrel, T., Gao, Z., Gao, Z., Ehrlich, S. M., Fields, J. Z. e Boman, B. M. 2001a. Evidence that APC regulates survivin expression: a possible mechanism contributing to the stem cell origin of colon cancer. *Cancer research* 61: 8664-8667.

Zhang, Q. L., Liu, J. G., Chao, H., Xue, G. Q. e Ji, L. N. 2001b. DNA-binding and photocleavage studies of cobalt(III) polypyridyl complexes: $[\text{Co}(\text{phen})_2\text{IP}]^{3+}$ and $[\text{Co}(\text{phen})_2\text{PIP}]^{3+}$. *J Inorg Biochem* 83: 49-55.

Zhao, L., Wang, H., Li, J., Liu, Y. e Ding, Y. 2008. Overexpression of Rho GDP-dissociation inhibitor alpha is associated with tumor progression and poor prognosis of colorectal cancer. *Journal of Proteome Research* 7: 3994-4003.

Zheng, S. Q., Li, Y. X., Zhang, Y., Li, X. e Tang, H. 2011. MiR-101 regulates HSV-1 replication by targeting ATP5B. *Antiviral Res* 89: 219-226.

Zoubeydi, A. e Gleave, M. 2012. Small heat shock proteins in cancer therapy and prognosis. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 44: 1646-1656.

ANEXO

Anexo I – Poster intitulado *Anti-proliferative activity and biological targets of Pt(II) and Cu(II) compounds*.

Anti-proliferative activity and biological targets of Pt(II) and Cu(II) compounds

J. F. Silva¹, A. C. Silva^{1,2}, D. V. Luís^{1,2}, S. Santos^{1,2,3}, AS Mendo¹, L. Coito¹, G. Cabral⁴, P. Videira⁴, A. S. Rodrigues⁵, J. Lasri³, A. Charmier^{1,3}, M. F. C. Guedes da Silva^{1,3}, Z. Ma³, A. J. L. Pombeiro³, A. R. Fernandes^{1,3,6}

¹EE, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Campo grande 376, Lisbon, 1749-024, Portugal. ²Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Av. Prof. Gama Pinto, Lisbon, 1649-003, Portugal. ³QCE, Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa, Avenida Rovisco Pais 1, Lisbon 1049-001, Portugal. ⁴CEDOC, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa, Campo das Mártires da Pátria, 130, Lisbon, 1169-056, Portugal. ⁵CIGMH, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa, R. da Junqueira 100, Lisbon, 1349-008, Portugal. ⁶Departamento de Ciências da Vida, FCT, Universidade Nova de Lisboa, Campus de Caparica, Almada, 2829-516, Portugal.

Background

Cis-diamminodichloro-platinum(II) (cisplatin), the first platinum compound applied to cancer therapy^[1], was synthesized in 1845, but its anti-tumor activity was only described in 1965 by Rosenberg, being approved for clinical use in 1978^[2]. This agent showed great anti-tumor activity in different cancer types, particularly in testicular cancer, and others such as ovarian, bladder and head and neck malignancies^[3]. However, there were reported the development of toxicity in healthy tissues after cisplatin treatment, such as nephrotoxicity, and even the existence of acquired or intrinsic resistance^[4]. The drawbacks address to this platinum agent lead to a demand of new organometallic compounds that have great anti-tumor potential and even to overcome the side effects and tumor resistance problems of cisplatin and other chemotherapeutic agents^[2,4]. Therefore, being cisplatin a very effective chemotherapeutic agent, the search of new compounds is focused in platinum-based therapy^[2]. *Trans* configured platinum complexes have gain a major importance in this matter once they demonstrated anti-tumor activity equal to cisplatin and shown to be able of overcoming the resistance problems of tumor cells to cisplatin, mainly because of the distinct adducts formed by these compounds^[5]. Copper compounds have been also a focus in the discover of new anti-tumor compounds due to their different mechanism of action and toxicity compared to platinum compounds, having demonstrated great success in the treatment of tumors that are poor sensitive or acquired resistance to platinum drugs^[6].

In this work we have assessed and characterized the anti-tumor properties of a *trans*-[PtCl₂(R)(=O)N=CN-(H)C(Me)₂-CH₂CH₂]₂ (R=CH₂CO₂Me) Pt complex and two copper (Cu) compounds, regarding:

- I. Cytotoxicity against tumor cell lines and selectivity for malignant cells
- II. Mechanism of induced cell death
- III. Interference in cell cycle progression
- IV. DNA interaction

Methods

Loss of cell viability induced by the Pt(II) complex and the two Cu(II) compounds was assessed by MTS colorimetric assay in human colorectal (HCT116) and hepatocellular (HepG2) carcinomas. The cells were treated with increasing concentrations of the three compounds and incubated for 48h at 37°C, 5% CO₂ (v/v) and 99% of relative humidity. Cytoselectivity was also evaluated by MTS colorimetric assay in human non-tumor fibroblasts.

Cell death was evaluated by:

- I. fluorescence microscopy after Hoechst 33258 staining of HCT116 and HepG2 cells.
- II. flow cytometry analysis with double-stained Annexin V-FITC/PI in HCT116 cells.

For both assays the cells were incubated in the presence of increased concentrations of the Pt(II) complex and the Cu(II) compounds for 48h at 37°C, 5% CO₂ (v/v) and 99% of relative humidity.

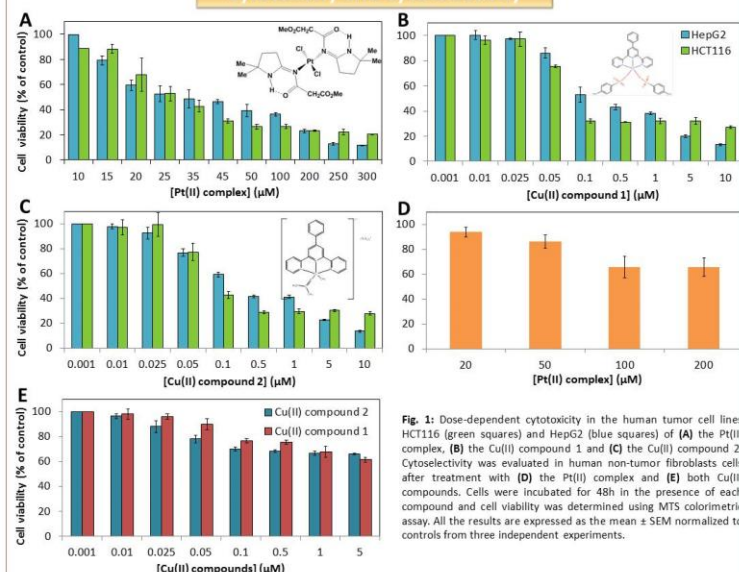
Cell cycle progression was assessed by flow cytometry with PI staining of HCT116 cells incubated with Pt(II) complex and the Cu(II) compounds for 4h and 8h, respectively, at 37°C, 5% CO₂ (v/v) and 99% of relative humidity.

Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) was realized using plasmid DNA pBSKII (Agilent Technologies) (200 ng) incubated with increasing concentrations of the Pt(II) complex and both Cu(II) compounds in 50 mM Tris-HCl 10 mM NaCl (pH 7.25) buffer, with a final volume of 20 µL, for 24h at 37°C. Samples were separated electrophoretically in an 0.7% (w/v) agarose gel in TAE 1x buffer and analyzed by densitometry.

Chromosomal aberrations were assessed using chinese hamster pulmonary fibroblasts (V79 cells) treated with 5, 10 and 20 µM of the Pt(II) complex, 1.5 µM of Mitomycin C (positive control) and 1% (v/v) of DMSO (vehicle control), and incubated for 14h at 37°C, 5% CO₂ (v/v) and 99% of relative humidity. Colchicine (4 mg/mL) was added to each tube and cells were incubated for 2h in same conditions, fixed with a solution of methanol/acetic acid (3:1 (v/v)) and stained with Giemsa. Chromosomal aberrations were evaluated using optical microscopy.

Results and Discussion

Cytotoxicity and Cytoselectivity



The three compounds showed *in vitro* cytotoxicity against the two human tumor cell lines HCT116 and HepG2 in a dose dependent manner (Fig. 1). It was determined IC₅₀ values of 35 µM and 45 µM, respectively for HCT116 and HepG2, in the presence of the Pt(II) complex, and IC₅₀ values of 0.06 µM and 0.2 µM for both Cu(II) compound 1 and 2 in HCT116 and HepG2, respectively. Additionally, we were able to observe some **cytoselectivity regarding malignant cells**, since the incubation of human non-tumor fibroblasts in the presence of the three compounds showed higher IC₅₀ values compared with HCT116 and HepG2 tumor cell lines.

Cell Death

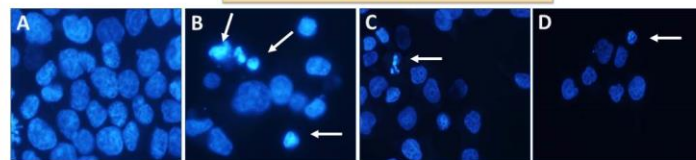


Fig. 2: Fluorescence microscopy images of Hoechst 33258 staining HCT116 cells (A) untreated (0.2% DMSO) and treated with (B) 35 µM of Pt(II) complex, (C) 0.1 µM of Cu(II) compound 1, and (D) 0.1 µM of Cu(II) compound 2. Cells were incubated with DMSO and the compounds for 48h. Nuclear fragmentation and chromatin condensation are indicated by arrows. This was also observed for HepG2 cells (data not shown).

After incubation of HCT116 and HepG2 tumor cell lines with the Pt(II) complex and the two Cu(II) compounds **nuclear condensation and fragmentation**, typical morphological features of apoptotic cells, were observed by fluorescence microscopy.

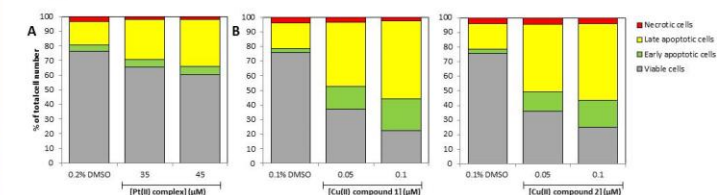


Fig. 3: Flow cytometry analysis after double-staining with annexin-V-FITC and PI of HCT116 cells. (A) Cells untreated (0.2% DMSO) and treated with the Pt(II) complex at 35 µM and 45 µM; (B) Cells untreated (0.1% DMSO) and treated with the two Cu(II) compounds at 0.05 µM and 0.1 µM. Cells were incubated in the presence or absence (vehicle control) of the compounds for 48h.

Flow cytometry analysis with double staining with annexin V-FITC and PI was used to confirm the induction of the apoptotic process in HCT116 cells by the Pt(II) complex and both Cu(II) compounds. At a concentration of **35 µM of the Pt(II) complex it was induced 32.5% of apoptotic cells** by contrast with only 2.2% of necrosis. However, the low number of apoptotic cells and the higher percentage of viable cells expected at this concentration (Fig. 1), might suggest a possibly interference of the Pt(II) complex in cell cycle progression instead of inducing apoptosis. In the other hand both Cu(II) compounds at 0.05 µM induced a higher percentage of apoptosis, **59.7% of apoptotic cells**, and only 3.4% (Cu(II) compound 1) and 4.5% (Cu(II) compound 2) of necrotic cells.

Cell Cycle Progression

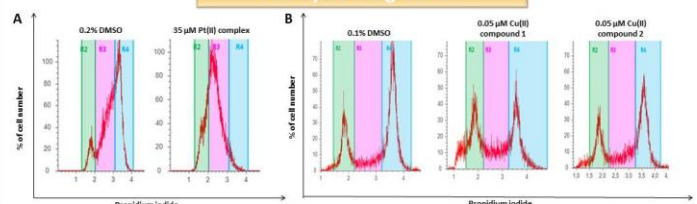


Fig. 4: Flow cytometry analysis with PI staining of HCT116 cells. Cell distribution in the three phases of the cell cycle (G0/G1, S and G2/M) for (A and C) untreated (0.2% DMSO) and treated with 35 µM of the Pt(II) complex for 4h, and (B and D) untreated (0.1% DMSO) and treated with 0.05 µM of Cu(II) compounds 1 and 2 for 8h.

Cell cycle progression as a mechanism of action of the three compounds was evaluated by flow cytometry after PI staining. HCT116 cells exposed to **Pt(II) complex after 4h demonstrated that the complex is able to interfere with cell cycle progression since a greater number of cells in S phase (approximately 70.6%)** and a smaller number of cells in G0/G1 and G2/M phases (around 18.6% and 10.3%, respectively) comparing to control (0.2% DMSO) were observed. In the other hand, the effects of both Cu(II) compounds are thought to delay some cells in the G0/G1 phase once the number of cells in the presence of the Cu(II) compounds is higher than those of the control (0.1% DMSO): **30.3% and 27.5%, for Cu(II) compounds 1 and 2, respectively**, and 22% for the control. These cell cycle alterations in the presence of the Pt(II) complex and the two Cu(II) compounds are being validated by measuring the mRNA levels of cyclins and cyclin-dependent kinases (CDKs) by Real Time PCR.

DNA Interaction

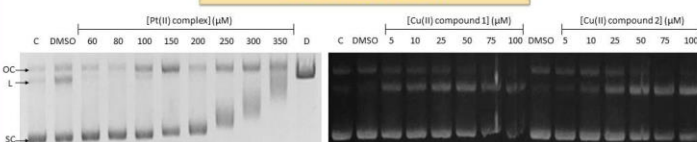


Fig. 5: Electrophoretic mobility pattern in a 0.7% (w/v) agarose gel of pBSKII incubated with (A) 1.5% DMSO and 60-350 µM of the Pt(II) complex, and with (B) 9.5% DMSO and 10-100 µM of Cu(II) compounds 1 and 2. All reactions were realized in 50 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl (pH 7.25) for 24h at 37°C. SC: pDNA supercoiled form; OC: pDNA open circular form; L: pDNA linear form. Lane C: untreated plasmid DNA; Lane D: plasmid DNA digested with EcoRI.

In summary, the DNA molecule is the major cellular target for platinum complexes and other chemotherapeutics agents, leading to their anti-tumor activity^[6]. Thus, interaction studies between these compounds and DNA are important to give an insight into their mechanism and mode of action. The Pt(II) complex leads to a reduction of the electrophoretic mobility of the supercoiled form of plasmid DNA at enhanced concentrations, and suggests that the complex might induce the formation of adducts in DNA. However, like it was observed in V79 cells, it seems that the Pt(II) complex does not have genotoxic effects once it did not induce chromosomal aberrations in these cells; it is believed that this Pt(II) complex has not the capacity to enter in the cells, neither in the nucleus, to induce DNA damage (data not shown). All these data possibly indicate that the Pt(II) complex interacts with other cellular targets such as proteins. Our group is currently performing proteomic assays to confirm this hypothesis. However, the two Cu(II) compounds might induce DNA double strand breaks when interacting with DNA by direct exposure. Nevertheless, in order to confirm this hypothesis single cell gel electrophoresis assays (comet assay) for both compounds are under study.

References

- [1] Dosoio, B. 2004. "Metals and Metal Compounds in Cancer Treatment." *Anticancer Research* 24: 1529-1544.
- [2] Kelland, L. 2007. "The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy." *Nature Reviews Cancer* 7: 573-584.
- [3] Kostova, I. 2006. "Platinum Complexes as Anticancer Agents." *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery* 1: 1-22.
- [4] Marzano, C., Pellet, M., Tisato, F. and Santini, C. 2009. "Copper Complexes as Anticancer Agents." *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 9: 185-211.
- [5] Coluccia, M. and Natte, G. 2007. "Trans-Platinum Complexes in Cancer Therapy." *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 7: 111-123.
- [6] Palchoudhuri, R. and Herenrother, P. J. (2007). "DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action." *Current Opinion in Biotechnology* 18: 497-503.